



Activation de la voie NF-kB par les protéines Tax des HTLV : Rôles des modifications post-traductionnelles et de la localisation de Tax

Amandine Bonnet

► To cite this version:

Amandine Bonnet. Activation de la voie NF-kB par les protéines Tax des HTLV : Rôles des modifications post-traductionnelles et de la localisation de Tax. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T069 . tel-00805542

HAL Id: tel-00805542

<https://theses.hal.science/tel-00805542>

Submitted on 28 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes
12 Rue de l'Ecole de Médecine
75006 PARIS

Institut Cochin
Département BioCIHP
INSERM U1016
CNRS UMR8104
Université Paris Descartes
22 Rue Méchain
75014 PARIS

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : Virologie

ECOLE DOCTORALE B3MI :

BIOCHIMIE, BIOTHERAPIES, BIOLOGIE MOLECULAIRE ET INFECTIOLOGIE

Présentée par

Amandine BONNET

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris Descartes

Activation de la voie NF- κ B par les protéines Tax des HTLV : Rôles des modifications post-traductionnelles et de la localisation de Tax

Directrice de thèse : Dr. Claudine PIQUE

Soutenue le jeudi 15 Novembre 2012 à 14h30

Devant le jury composé de :

Pr. Claire LEGAY

Dr. Pierre JALINOT

Dr. Luc WILLEMS

Dr. Stéphane EMILIANI

Dr. Christine NEUVEUT

Dr. Claudine PIQUE

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Mmes Claire LEGAY et Christine NEUVEUT et MM. Stéphane EMILIANI, Pierre JALINOT et Luc WILLEMS d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je souhaiterais ensuite remercier tous les membres de l'Institut Cochin qui ont contribué à la réussite de cette aventure qu'est la thèse, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain. A tous, merci! En particulier :

Merci Claudine de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir donné la chance de faire mes preuves dans la recherche. Tu as toujours été disponible pour moi, qu'il s'agisse de discussions scientifiques théoriques ou de questions pratiques et techniques. Je te remercie pour ton optimisme et ton enthousiasme toujours présent quelque soient les résultats et qui ont su si bien contrebalancer mon "léger" pessimisme. Tes nombreuses idées nous ont toujours permis de rebondir et de ne jamais rester sur des échecs. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris et beaucoup mûri durant cette thèse : je ne vois plus les choses de la même façon qu'il y a trois ans et j'ai fait des choses dont je me pensais incapable. Merci pour tout.

Merci Laurence d'avoir toujours été disponible pour discuter de Science, ou de la vie tout simplement. Tes conseils se sont très souvent révélés judicieux et précieux. Tu sais toujours trouver les mots justes pour réconforter et essayer de trouver des solutions à tous types de problèmes. Je dois aussi te remercier pour m'avoir fait connaître la chorale de gospel, c'est grâce à toi que je casse les oreilles de tout le monde depuis le P2 et j'en suis ravie.

Merci Vohangy pour les nombreuses heures où tu m'as tenu compagnie au P2 et nos longues discussions. Tu m'as toujours apporté un avis très intéressant et neuf sur mon projet scientifique mais tu t'es aussi toujours intéressée à mes préoccupations et ma vie à l'extérieur du labo et j'ai souvent pu profiter de tes conseils. Je t'en remercie et c'est vraiment dommage que tu sois partie si vite.

Merci Cécilia pour ta bonne humeur permanente et ton rire communicatif. Merci aussi d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions scientifiques et apporter un avis extérieur très important sur notre projet et de m'avoir si souvent prodigué tes conseils en anglais. Toutes nos discussions non scientifiques ont également été des moments très agréables pour moi.

Merci Pat et « Petit » Maxime, indissociables pour moi, d'avoir toujours été là pour me soutenir, m'écouter me plaindre et me changer les idées quand j'en avais besoin. Merci à toi, Maxou, d'avoir fait le DJ du labo pendant ces quatre années pour rythmer mes manip. Même si tes goûts musicaux ne sont pas tout à fait les miens, tu as réussi à élargir ma culture musicale et à me faire découvrir et apprécier un certain nombre de musiques que je n'aurais sûrement pas écouté autrement. Il n'y a que sur les goûts cinématographiques je crois que nous n'arriverons jamais à nous rejoindre. Quant à toi Pat, tu as toujours amené le soleil dans le labo et tu n'as jamais rien laissé te démoraliser (et surtout pas Dlg). Tu as toujours été disponible pour moi, que ce soit pour me donner des conseils, discuter ou simplement rigoler et

décompresser. Je crois que vous êtes un peu fous mais ne changez rien, vous êtes géniaux. Nous sommes très différents à la base et pourtant nous avons tant partagé durant ces quatre ans dans notre petit bureau. Des moments inoubliables qui ont fait passer cette thèse si vite...

Merci Laetitia pour ta douceur et ta gentillesse, d'être toujours prête à écouter les problèmes des autres sans jamais se plaindre elle-même. Toujours prête à se dévouer pour régler n'importe quel problème, quel qu'il soit. Tu as fait rentrer un peu de la sagesse qui manquait à notre pièce mais je crois que la contamination par la douce folie ambiante a déjà fait son effet. Je compte sur toi pour représenter et défendre la Normandie contre les nombreuses attaques "non fondées bien sûr" dont elle est la cible (telles que la pluie permanente...).

Merci Martine pour ta gentillesse, ton aide précieuse et pour avoir été présente tous les jours avec le sourire et ta bonne humeur quoiqu'il arrive. Tu as toujours été aux petits soins avec moi et tu as tout fait pour me faciliter la tâche et je te remercie sincèrement pour cela. Tes nombreuses anecdotes nous manquent beaucoup et me faisaient toujours beaucoup rire.

Merci Pat, Maxime, Cecilia, Laetitia et Martine pour avoir partagé avec moi les repas du midi. Merci pour votre courage de m'avoir attendu si souvent « quelques minutes ». Merci d'avoir animé ces repas et d'en avoir fait des moments de pause très importants pour repartir de bon pied l'après-midi.

Merci Anne-Lise de m'avoir tenu compagnie de si nombreuses soirées voire débuts de nuit. C'était toujours rassurant de ne pas se savoir toute seule à l'étage et de pouvoir discuter un peu en attendant la fin du transfert à minuit.

Merci Maryline d'avoir su si bien répondre à toutes mes questions administratives et d'être une gestionnaire si dynamique et si enthousiaste.

Je remercie également nos collaborateurs Renaud Mahieux et Chloé Journo avec qui j'ai beaucoup aimé travailler. Merci pour vos avis neufs sur notre travail et vos remarques toujours constructives. En particulier, merci à toi Chloé pour nos discussions scientifiques enrichissantes ainsi que pour ta gentillesse, ton écoute et ta disponibilité quelque soient les circonstances.

Enfin, j'aimerais remercier mes amis et ma famille.

Merci à mes amis qui m'ont accompagnés dès le début au lycée et en prépa (Gaëlle, Damien, Florian et Steeve) puis ceux qui m'ont accompagnés à l'ENS, en particulier Angélique et Vérane, et qui m'ont permis d'arriver où je suis aujourd'hui en suivant un parcours des plus agréables.

Merci à Kikor, Fanny et Moun, Perline et Mika et Mirane et Sexo pour m'avoir permis de m'évader régulièrement de la thèse et du labo.

Merci à mes parents qui ont toujours été là pour moi et m'ont toujours encouragée, de même que le reste de ma famille.

Et surtout, merci à mon Chéri, sans qui je n'y serai sûrement pas arrivée. Merci d'avoir été si patient, d'avoir été là pour moi à n'importe quelle heure du jour et de la nuit, d'avoir pris si bien soin de moi.

RESUME

Le virus T lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1, *Human T cell Leukemia Virus type 1*) est l'agent responsable de la leucémie à cellules T de l'adulte, une prolifération maligne de lymphocytes T CD4+. L'activation constitutive de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T exprimant la protéine virale Tax s'est révélée primordiale pour la prolifération et la transformation induites par HTLV-1. Selon le modèle classique, Tax agit à deux niveaux de la voie NF- κ B. Dans le cytoplasme, Tax active constitutivement le complexe IKK (*I κ B Kinase*) en se liant à sa sous-unité régulatrice NEMO/IKK γ . Dans le noyau, Tax interagit directement avec les dimères NF- κ B dans des corps nucléaires Tax. L'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax ont été initialement décrites comme nécessaires pour l'activation de la phase cytoplasmique et de la phase nucléaire respectivement. Cependant, les mécanismes régulateurs des modifications post-traductionnelles de Tax restent difficiles à identifier car il n'a pas été possible d'étudier séparément l'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax.

Au laboratoire, nous avons généré et caractérisé fonctionnellement un nouveau mutant de Tax qui nous a permis de découpler les rôles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation de Tax. Tax-P79AQ81A est ubiquitinylé de façon quantitativement similaire à Tax mais présente une forte réduction (80%) de SUMOylation. De plus, Tax-P79AQ81A ne forme pas de corps nucléaires. Néanmoins, ces deux défauts ne semblent pas préjudiciables pour la capacité du mutant à activer la voie NF- κ B non seulement dans des lignées cellulaires mais également dans des lymphocytes T CD4+ primaires. En parallèle, nous avons montré que les corps nucléaires Tax sont rarement présents dans des lymphocytes T chroniquement infectés par HTLV-1, renforçant l'idée que ces structures ne sont pas requises pour l'activation de la voie NF- κ B et probablement pas pour les autres fonctions de Tax. Enfin, nous avons démontré que les capacités d'activation de la voie NF- κ B de différents mutants de Tax sont fortement corrélées à leur niveau d'ubiquitinylation mais pas de SUMOylation, confirmant que l'ubiquitinylation de Tax est la modification essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B.

Le virus HTLV-2 ne possède pas les propriétés transformantes du virus HTLV-1 et les propriétés de la protéine Tax2 comparées à celles de Tax1 pourraient être à l'origine des différences de pathogénicité entre les deux virus. Notre étude a révélé que, de façon surprenante, l'activation de la voie NF- κ B par la protéine Tax2 est non seulement indépendante de la SUMOylation et de la formation des corps nucléaires comme pour Tax1, mais également indépendante d'une quelconque ubiquitinylation, suggérant des mécanismes différents d'activation du complexe IKK par Tax1 et Tax2.

Nos études, aussi bien de la protéine Tax1 que de la protéine Tax2, nous ont donc permis de revisiter le modèle actuel d'activation de la voie NF- κ B en démontrant l'impact mineur de la SUMOylation et en révélant une différence majeure en ce qui concerne le rôle de l'ubiquitinylation, distinguant les virus HTLV-1 et HTLV-2.

Mots clés : Tax, HTLV-1, HTLV-2, ubiquitinylation, SUMOylation, corps nucléaire, NF- κ B

Activation of the NF- κ B pathway by the Tax proteins of the HTLV viruses: Roles of Tax post-translational modifications and localization

Human T cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of adult T-cell leukemia (ATL), a CD4⁺ T-cell malignancy. Constitutive activation of the NF- κ B pathway plays a crucial role in cell proliferation and transformation induced by HTLV-1. According to the classical model, Tax acts at two levels on the NF- κ B pathway. In the cytoplasm, Tax activates the I κ B kinase (IKK) complex by directly interacting with the regulatory subunit NEMO/IKK γ . In the nucleus, Tax directly interacts with the NF- κ B dimers in particular structures named Tax nuclear bodies. Both ubiquitinylation and SUMOylation were initially considered as critical for activation of the cytoplasmic or nuclear phase, respectively. However, the individual role of each modification was difficult to assess because of the lack of molecular tools allowing to study Tax ubiquitination and SUMOylation separately.

In the laboratory, we functionally characterized a new Tax mutant, Tax-P79AQ81A, which gave us the opportunity to uncouple Tax ubiquitination and SUMOylation. Indeed, Tax-P79AQ81A is ubiquitinated similarly to wild-type Tax but is severely reduced in SUMOylation. In addition, Tax-P79AQ81A does not form nuclear bodies. However, despite these two severe defects, we found that the mutant is fully able to activate the NF- κ B pathway not only in cells lines but also in CD4⁺ primary T cells. Moreover we showed that Tax nuclear bodies are hardly present in HTLV-1 chronically infected T cell lines, confirming the idea that these structures are not required for Tax-induced NF- κ B activation and probably for other Tax functions. Finally, we demonstrated that ability of different Tax mutant to activate the NF- κ B pathway is strongly correlated with their ubiquitination but not SUMOylation level, confirming that ubiquitination is the key Tax modification required for activation of the NF- κ B pathway.

In contrast to HTLV-1, the related HTLV-2 virus is not a transforming virus and therefore, the properties of the Tax2 protein compared to that of Tax1 could be responsible for the different pathogenicity of HTLV-2 and HTLV-1. We studied the post-translational modifications of Tax2 and surprisingly, found that Tax2-induced NF- κ B activation is not only independent of SUMOylation and nuclear body formation but also of ubiquitination, suggesting different mechanisms of activation of the IKK complex by Tax1 and Tax2.

In conclusion, our results led us to propose a new model for both Tax1- and Tax2-induced NF- κ B activation in which SUMOylation has a minor role and in which the requirement of Tax ubiquitination distinguishes between HTLV-1 and HTLV-2.

Key words: Tax, HTLV-1, HTLV-2, ubiquitination, SUMOylation, nuclear bodies, NF- κ B

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX	20
INTRODUCTION.....	21
I. LES VIRUS HTLV.....	23
A. <i>HTLV, le premier rétrovirus humain : une histoire de découvertes.....</i>	23
B. <i>Classification des virus PTLV.....</i>	29
1. Les virus PTLV, des rétrovirus uniques en leur genre.....	29
2. Les PTLV : un groupe phylogénétique bien identifié.....	30
3. Les virus HTLV-1 et HTLV-2 : de faibles variations riches en enseignement	32
a) <i>Les virus HTLV-1 et STLV-1 : leçons d'Histoire et de Géographie</i>	34
b) <i>Les virus HTLV-2 : des virus à deux vitesses</i>	37
C. <i>Les virus HTLV-1 et HTLV-2 dans le monde actuel : Epidémiologie.....</i>	39
1. La prévalence des virus HTLV dans le monde	39
a) <i>Le virus HTLV-1 : pas de juste milieu.....</i>	39
b) <i>HTLV-2 : un virus à deux visages.....</i>	41
2. Les modes de transmission des virus HTLV	43
a) <i>La transmission de la mère à l'enfant.....</i>	43
b) <i>Les transmissions sexuelle et sanguine.....</i>	43
3. Moyens de prévention	44
a) <i>Prévention de la transmission mère-enfant.....</i>	44
b) <i>Prévention de la transmission sexuelle et sanguine</i>	45
II. LE VIRUS HTLV-1 : UN RETROVIRUS LYMPHOTROPE QUI JOUE A CACHE-CACHE AVEC LE SYSTEME	
IMMUNITAIRE	46
A. <i>La particule virale</i>	46
1. Composition de la particule virale.....	46
2. Le génome viral	48
B. <i>Le cycle de multiplication : un classique pour un rétrovirus.....</i>	52
1. Le détournement de 3 récepteurs pour l'entrée du virus.....	53
2. Du virus au provirus : la transcription inverse et l'intégration, étapes clés du cycle des rétrovirus.	56

3.	La synthèse des nouveaux composants viraux, une étape finement régulée dans le temps et dans l'espace	58
4.	La formation de la particule virale : avant et après le bourgeonnement.....	63
C.	Cellules cibles du virus : essentiellement des cellules immunitaires	65
1.	Les lymphocytes T	66
a)	CD4+/CD8+ : un tropisme différent pour les virus HTLV-1 et HTLV-2	66
b)	HTLV-1 et les LT CD4+ : oui, mais pas n'importe lesquels !.....	67
2.	Les autres cellules cibles	68
a)	Les cellules immunitaires	69
b)	Les autres cellules.....	70
D.	Système immunitaire contre HTLV-1 : un équilibre précaire.....	71
1.	Un arsenal pour lutter contre l'infection par HTLV-1.....	71
a)	Un rôle de l'immunité intrinsèque controversé	71
b)	Les Interférons de type I : la défense anti-virale par excellence	72
c)	La protéine Tax, la cible préférée de la réponse immunitaire adaptative cellulaire.....	73
2.	Stratégies d'échappement au système immunitaire	76
a)	Contre-mesures à la réponse immunitaire	76
b)	La transmission cellule-cellule : un jeu de cache-cache.....	78
c)	La multiplication clonale : ne plus mettre le nez dehors.....	82
d)	Faire le mort, une stratégie efficace : la répression de l'expression virale	84
E.	Pathologies associées à HTLV-1 : le déséquilibre des forces en présence.....	86
1.	Leucémie à cellules T de l'adulte (ATL)	86
a)	Une lymphoprolifération maligne.....	86
b)	Les propriétés oncogéniques du virus HTLV-1 : implication de Tax mais pas seulement.....	88
c)	ATLL et immunosuppression	91
d)	Modèles d'étude et traitements : encore beaucoup de travail.....	91
2.	Paraparésie Spastique Tropicale / Myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM).....	94
a)	Une myélopathie chronique.....	94
b)	HTLV-1 et une réponse immunitaire exacerbée.....	96
c)	Modèles d'étude et traitements : toujours plus de travail.....	99
3.	Plusieurs autres pathologies associées au virus HTLV-1	101
4.	HTLV-2 : un pouvoir pathogène beaucoup plus faible	101
III.	TAX, UNE ONCOPROTEINE CHEF-D'ORCHESTRE	102
A.	Tax, une protéine pléiotropique avec un objectif unique : prolifération et transformation des cellules	102
1.	Tax et l'activation de nombreuses voies de signalisation : multiplication des signaux de survie et de prolifération.....	102

a)	<i>PI3K/Akt</i>	102
b)	<i>MAP Kinases</i>	104
c)	<i>NF-κB</i>	106
2.	Tax et la modulation de l'expression des gènes cellulaires : de nombreuses cibles.....	113
a)	<i>Activation des facteurs de transcription</i>	113
(1)	CREB/ATF.....	113
(2)	AP-1	114
(3)	SRF.....	114
(4)	NF-κB.....	115
b)	<i>Une régulation post-transcriptionnelle</i>	116
3.	Tax et la stimulation de la prolifération cellulaire.....	118
a)	<i>Un effet indirect : les boucles autocrines ou paracrines de cytokines</i>	118
b)	<i>Un effet direct : l'accélération du cycle cellulaire</i>	119
(1)	L'accélération de la transition G1/S : vers une prolifération cellulaire accentuée	121
(2)	L'accélération de la fin du cycle : une question de sélection	122
4.	Tax et l'apparition d'anomalies génétiques dans les cellules infectées : un rôle actif.....	123
a)	<i>Tax, une action mutagène directe et indirecte</i>	123
(1)	Tax, un générateur de stress	123
(2)	Inhibition de la réparation de l'ADN.....	124
b)	<i>Induction de l'instabilité chromosomique</i>	127
5.	Tax et l'apoptose : un équilibre à trouver	128
a)	<i>Tax, protecteur de l'apoptose</i>	129
b)	<i>La face cachée de Tax : l'induction de la mort cellulaire</i>	131
B.	<i>Une structure et une localisation subcellulaire adaptées aux fonctions multiples de la protéine</i>	133
1.	Une localisation bien caractéristique en foyers.....	133
a)	<i>Des foyers nucléaires : les corps nucléaires</i>	134
b)	<i>Des agrégats cytoplasmiques</i>	138
c)	<i>Tax, une protéine dynamique</i>	141
2.	Tax, une protéine multi-domaines peu structurée	142
C.	<i>Les modifications post-traductionnelles, une fine régulation des nombreuses fonctions de Tax</i>	144
1.	Tax, une phosphoprotéine	145
2.	Une isomérisation des prolines activatrice	146
3.	Les lysines de Tax, cibles de multiples modifications et activation de la voie NF-κB.....	146
a)	<i>Acétylation</i>	146
b)	<i>Ubiquitylation</i>	147
(1)	L'ubiquitine et sa conjugaison aux protéines	147

(2) Les chaînes d'ubiquitine : un code à élucider	149
(3) L'ubiquitine et la voie NF- κ B : indissociables	151
(4) L'ubiquitinylation de Tax et l'interaction avec la voie NF- κ B	154
c) SUMOylation	157
(1) Les protéines SUMO : unité et diversité	157
(2) SUMO et la voie NF- κ B : le début d'une histoire	160
(3) La SUMOylation de Tax et l'interaction avec la voie NF- κ B	162
D. Tax2 : en partie responsable de la faible pathogénicité du virus HTLV-2	164
1. Tax1 et Tax2, une différence de structure : le domaine PBM	164
2. Tax1 et Tax2, une différence de localisation : nucléaire versus cytoplasmique	165
3. Tax1 et Tax2, une différence de modifications post-traductionnelles	166
4. Tax1 et Tax2, une différence d'activation, notamment des voies NF- κ B	166
IV. LE MODELE ACTUEL DE L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB PAR TAX ET NOUVELLES PROBLEMATIQUES	168
A. La voie NF- κ B, une voie essentielle dans les propriétés transformantes de Tax ...	168
B. L'activation de la voie NF- κ B par Tax : le modèle actuel	169
C. Problématiques	171
1. Les protéines TRAF, des ubiquitines ligases de Tax ?	172
2. Ubiquitinylation et SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B : chacun son rôle ..	173
3. rôle des corps nucléaires dans l'activation de la voie NF- κ B	174
4. Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax2	174
MATERIEL ET METHODES	175
I. CELLULES	176
II. PLASMIDES ET siARN	176
III. ANTICORPS	178
IV. TRANSFECTION TRANSITOIRE	178
V. ANALYSE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES	179
VI. IMMUNOPRECIPITATION	179
VII. FRACTIONNEMENT	180
1. séparation des fractions solubles et insolubles	180
2. Séparation en 3 fractions	180
VIII. IMMUNOBLOT ET QUANTIFICATION	181
IX. TEST DE TRANSACTIVATION DE PROMOTEUR	182
X. IMMUNOFLUORESCENCE	183

RESULTATS.....184

I. RESULTATS NON PUBLIES : LES PROTEINES TRAF, DES REGULATEURS POTENTIELS DE

L'UBQUITINYLATION DE TAX185

- A. *TRAF5, un régulateur positif de l'ubiquitinylation de Tax..... 185*
- B. *TRAF2 et TRAF1, des régulateurs négatifs de l'ubiquitinylation de Tax..... 186*
 - 1. *TRAF2, un régulateur négatif inattendu..... 186*
 - 2. *TRAF1 et TRAF2 coopèrent pour inhiber l'ubiquitinylation de Tax..... 187*
- C. *Les protéines TRAF et l'activation de la voie NF- κ B 189*
- D. *Un motif potentiel d'interaction avec les protéines TRAF..... 191*

II. LA SUMOYLATION ET LES CORPS NUCLEAIRES TAX NE SONT PAS NECESSAIRES POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B (ARTICLE 1)194

- A. *Les protéines Tax mutées dans le motif PxQxT présentent des défauts de SUMOylation plus ou moins sévères 194*
- B. *Tax-P79AQ81A et l'activation de la voie NF- κ B ou l'absence de nécessité de SUMOylation et de formation des corps nucléaires pour activer cette voie..... 195*
 - 1. *Caractérisation des modifications post-traductionnelles du double mutant Tax-P79AQ81A 195*
 - 2. *Caractérisation de la localisation subcellulaire de Tax-P79AQ81A : un défaut de formation des corps nucléaires 199*
 - 3. *Tax-P79AQ81A active la voie NF- κ B aussi bien que Tax..... 203*
 - a) *Tax-P79AQ81A active correctement la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B 203*
 - b) *Tax-P79AQ81A active la transcription dépendante de NF- κ B..... 207*
- C. *Les corps nucléaires Tax ne sont pas requis pour l'activation de la voie NF- κ B dans les lignées chroniquement infectées 211*
- D. *L'ubiquitinylation de Tax est essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B mais pas sa SUMOylation..... 213*
- E. *La fusion de SUMO1 stabilise Tax et favorise l'ubiquitinylation de Tax-P79AQ81A.... 221*

III. LA PROTEINE TAX2 ACTIVE LA VOIE NF- κ B SANS UBIQUITINYLATION NI SUMOYLATION NI

FORMATION DE CORPS NUCLEAIRES (ARTICLE 2)226

- A. *La protéine Tax2 n'est ni ubiquitinylée ni SUMOylée de façon significative..... 226*
- B. *La protéine Tax2 forme très peu de corps nucléaires 228*
- C. *La protéine Tax2 active la voie NF- κ B 230*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....234

I. L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX : L'UBIQUITINYLATION ET LA PHASE CYTOPLASMIQUE AU CŒUR D'UN NOUVEAU MODELE236

- A. *Les mutants de lysines à l'origine du modèle actuel : des mutants à double tranchant..... 236*
- B. *Les protéines de fusion à l'ubiquitine ou SUMO : un risque d'artéfact..... 237*
 - 1. Les protéines de fusion et le rôle de l'ubiquitylation et de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B 237
 - 2. Réconciliation de nos résultats avec les résultats obtenus précédemment 237
 - 3. RNF4, une enzyme occasionnelle de l'ubiquitylation de Tax 239
 - 4. Des fusions directement sur les lysines des protéines : un outil d'avenir 241
- C. *L'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax est dépendante de l'ubiquitylation de Tax..... 241*
 - 1. L'activation de la voie NF- κ B par Tax est essentiellement localisée dans le cytoplasme 242
 - 2. Un effet activateur de Tax dans le noyau ? 243
 - 3. Quelles chaînes d'ubiquitine sont essentielles à l'activation de la voie NF- κ B..... 244
 - 4. L'ubiquitylation de Tax : une cible thérapeutique 245
- D. *Quels rôles pour la SUMOylation de Tax ? 246*
 - 1. La SUMOylation de Tax n'est pas nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B 246
 - 2. D'autres rôles de la SUMOylation en dehors de la voie NF- κ B 247
- E. *Les autres modifications du mutant Tax-P79AQ81A 247*

II. LES CORPS NUCLEAIRES : FICTION OU REALITE ?.....248

- A. *Les acides aminés P79 et Q81 appartiennent au TSLS..... 248*
- B. *Corps nucléaires et SUMOylation : une association confirmée..... 249*
- C. *Quelles fonctions pour les corps nucléaires Tax ? 250*
 - 1. Les corps nucléaires Tax ne sont pas nécessaires pour l'activation de la voie NF- κ B..... 250
 - 2. De nombreuses fonctions possibles pour les corps nucléaires Tax 251
- D. *Les corps nucléaires : essentiellement observés dans cellules transfectées 253*

III. TAX2, UNE PROTEINE INDEPENDANTE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES.....255

- A. *Tax2 et Tax1, deux localisations subcellulaires différentes..... 255*
- B. *Tax2 active la voie NF- κ B canonique 256*
- C. *La protéine Tax2 n'est ni ubiquitylée ni SUMOylée..... 257*
 - 1. Le piège de la surexpression 257

2.	Une activation du complexe IKK indépendante de l'ubiquitine	258
IV.	LES ENZYMES DE MODIFICATION DE TAX	259
A.	<i>Les ubiquitines ligases (E3).....</i>	<i>259</i>
1.	Les protéines TRAF, des candidates à confirmer.....	259
2.	La comparaison Tax1/Tax2 : un outil puissant pour identifier les ubiquitines ligases de Tax1...	261
3.	D'autres options : pas d'E3 ou plusieurs E3	262
B.	<i>La régulation de la SUMOylation</i>	<i>263</i>
V.	CONCLUSION	264
	BIBLIOGRAPHIE	267
	ANNEXES.....	306

LISTE DES ABREVIATIONS

aa		acides aminés
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>	complexe de promotion de l'anaphase / cyclosome
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>	facteur de transcription activateur
ATL	<i>Adult T-cell Leukemia</i>	leucémie à cellules T de l'adulte
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia Lymphoma</i>	leucémie ou lymphome à cellules T de l'adulte
BER	<i>Base Excision Repair</i>	réparation par excision de base
BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>	virus de la leucémie bovine
BRCA-1	<i>Breast Cancer-1</i>	cancer du sein N°1
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>	protéine de liaison à CREB
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>	kinase dépendante des cyclines
Chk	<i>Checkpoint</i>	point de contrôle
ciAP	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis</i>	inhibiteur de l'apoptose cellulaire
CMH		complexe majeur d'histocompatibilité
CRE	<i>cAMP-Response Element</i>	élément de réponse à l'AMPcyclique
CREB	<i>cAMP Response Element Binding protein</i>	protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPcyclique
CRM1	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>	région de maintenance du chromosome 1
CYLD	<i>Cylindromatosis</i>	cylindromatose
DNA-PK	<i>DNA-dependent Protein Kinase</i>	protéine kinase dépendante de l'ADN
DUB	<i>Deubiquitinase</i>	déubiquitinase
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>	kinase régulée par un signal extracellulaire
HAM	<i>HTLV-1 Associated Myelopathy</i>	myélopathie associée à HTLV-1
HBZ	<i>HTLV-1 Basic leucin Zipper factor</i>	facteur à domaine bZip d'HTLV-1
hDlg	<i>human Disks large homolog</i>	homologue humain de Disks large
HECT	<i>Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus</i>	homologue à l'extrémité C-terminale de la protéine E6AP
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>	protéoglycanes à héparanes sulfates
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>	virus T lymphotrope humain
IFN-I		Interféron de type 1
IKK	<i>IκB Kinase</i>	kinase de I κ B
IL-2	<i>Interleukin-2</i>	Interleukine-2
IL-2R	<i>Interleukin-2 Receptor</i>	récepteur de l'interleukine 2
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>	inhibiteur de NF- κ B

iNKT	<i>invariant Natural Killer T cell</i>	cellule T Natural Killer invariante
IRAK	<i>IL-1R-Associated Kinase</i>	kinase associée à l'IL-1R
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>	facteur régulateur de l'interféron
IRS	<i>Induced Rapid Senescence</i>	sénescence rapidement induite
ISG	<i>IFN-Stimulated Gene</i>	gène activé par l'interféron
JAK	<i>Janus Kinase</i>	kinase Janus
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>	kinase de la partie N-terminale de c-Jun
L_T		Lymphocyte T
LT_C		Lymphocyte T cytotoxique
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>	Séquences répétées terminales
MAD	<i>Mitotic Arrest Deficient</i>	défectif pour l'arrêt mitotique
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	protéine kinase activée par les mitogènes
MCM	<i>Mini Chromosome Maintenance</i>	maintien des mini chromosomes
MDC1	<i>Mediator of DNA-damage Checkpoint 1</i>	médiateur du point de contrôle des dommages à l'ADN
MEKK	<i>Mitogen-activated protein/ERK Kinase Kinase</i>	kinase de la kinase de la protéine activée par les mitogènes et de ERK
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>	virus de la leucémie murine
MMR	<i>Mismatch Repair</i>	réparation des mésappariements
MTOC	<i>Microtubule Organizing Center</i>	centre organisateur des microtubules
NB	<i>Nuclear Body</i>	corps nucléaire
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>	modulateur essentiel de NF- κ B
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>	réparation par excision de nucléotide
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>	facteur nucléaire des cellules T activées
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>	facteur nucléaire κ B
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>	religature d'extrémités non-homologues
NIK	<i>NF-κB-Inducing Kinase</i>	kinase d'induction de NF- κ B
NK	<i>Natural Killer</i>	cellule Natural Killer
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>	signal de localisation nucléaire
NRP	<i>NEMO-Related Protein</i>	protéine apparentée à NEMO
NRP-1	<i>Neuropilin-1</i>	neuropiline-1
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	cadre ouvert de lecture
PBM	<i>PDZ Binding Motif</i>	motif de liaison au domaine PDZ
PBMC	<i>Primary Blood Mononuclear cells</i>	cellules mononucléaires circulantes du sang
PCAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>	facteur associé à p300/CBP
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	réaction de polymérisation en chaîne

pDC	<i>plasmacytoid Dendritic Cell</i>	cellule dendritique plasmacytoïde
PDZ		PSD95, Dlg, ZO-1
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-Kinase</i>	kinase du phosphoinositide-3
PML	<i>Promyelocytic Leukemia protein</i>	protéine de la leucémie promyélocytique
PS	<i>Perinuclear Spot</i>	agrégat périnucléaire
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>	facteur positif d'élongation de la transcription b
PTLV	<i>Primate T-cell Lymphotropic Virus</i>	virus T lymphotrope de primate
RE		Réticulum Endoplasmique
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>	nouveau gène vraiment intéressant
RIP1	<i>Receptor Interacting Protein 1</i>	protéine interagissant avec le récepteur 1
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>	Erreur type de la moyenne
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>	suppresseur de la signalisation des cytokines
SRF	<i>Serum Response Factor</i>	facteur de réponse au sérum
STAMBPL1	<i>STAM-Binding Protein-Like 1</i>	protéine de liaison à STAM
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>	activateur de la transcription et transducteur du signal
STLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>	virus T lymphotrope simien
STUbL	<i>SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase</i>	ubiquitine ligase ciblant les protéines SUMOylées
SU		sous-unité de surface
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>	petit modificateur similaire à l'ubiquitine
TAB	<i>TAK1 Binding Protein</i>	protéine de liaison à TAK1
TAK1	<i>TGFβ-Activated kinase 1</i>	kinase activée par le TGF β 1
TAX1BP	<i>Tax1 Binding Protein</i>	protéine de liaison à Tax1
TCR	<i>T Cell Receptor</i>	récepteur du lymphocyte T
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>	récepteur de type Toll
TM		sous-unité transmembranaire
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	facteur de nécrose tumorale
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>	récepteur du TNF
TORC	<i>Transducer of Regulated CREB activity</i>	protéine de transduction de l'activité CREB régulée
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>	facteur associé au récepteur du TNF
TRAIL	<i>TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>	ligand induisant l'apoptose et apparenté au TNF
TRE	<i>Tax Response Element</i>	élément de réponse à Tax
Treg		lymphocytes T régulateurs

TSP	<i>Tropical Spastic Paraparesis</i>	paraparésie spastique tropicale
TSS	<i>Tax Speckled Structures</i>	structures tachetées de Tax
Ubl	<i>Ubiquitin-like</i>	comme l'ubiquitine
VIH	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Répartition des causes de cancer. Adapté de (Mackay et al., 2006).	22
Figure 2 : Premières observations du virus HTLV-1 en microscopie électronique	27
Figure 3 : Classification des rétrovirus.	29
Figure 4 : Arbre phylogénétique des PTLV	31
Figure 5 : Représentation graphique des taux d'évolution des virus HTLV-1 et HTLV-2	33
Figure 6 : Répartition phylogénétique et géographique des sous-types d'HTLV-1	34
Figure 7 : Modèle de l'origine et de la dissémination des virus PTLV-1.	37
Figure 8 : Arbre phylogénétique des souches du virus HTLV-2	38
Figure 9 : Prévalence du virus HTLV-1 dans le monde	40
Figure 10 : Le virus HTLV-2 endémique ou épidémique	42
Figure 11 : Structure de la particule virale HTLV-1	47
Figure 12 : Organisation du génome du virus HTLV-1	49
Figure 13 : Organisation et clivage des précurseurs des protéines structurales et enzymatiques du virus HTLV-1	50
Figure 14 : Cycle de multiplication virale d'un rétrovirus	53
Figure 15 : Attachement de HTLV-1 à une cellule-hôte grâce à l'interaction de la sous-unité SU de la glycoprotéine d'enveloppe avec 3 récepteurs cellulaires différents.....	55
Figure 16 : Modèle de fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique	56
Figure 17 : Mécanismes moléculaires de la transcription inverse et de l'intégration.....	58
Figure 18 : Activation de la transcription à partir du promoteur viral par Tax.....	60
Figure 19 : Cinétique d'expression des ARNm viraux	62
Figure 20 : Maturation de la particule virale.....	65
Figure 21 : Les virus HTLV-1 et HTLV-2 induisent spécifiquement l'immortalisation des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ respectivement.	67
Figure 22 : Modèle de la transcytose du virus HTLV-1 à travers l'épithélium intestinal	70
Figure 23 : Effet d'un lymphocyte T cytotoxique sur une cellule infectée par un virus	75
Figure 24 : L'interféron de type I et le virus HTLV-1	77
Figure 25 : p12 réduit l'expression du CMH-I à la surface cellulaire.....	78
Figure 26 : La synapse virologique induite par le virus HTLV-1	80

Figure 27 : Deux modèles de transmission du virus après formation de la synapse virologique : à travers la synapse virologique et via un biofilm viral.....	81
Figure 28 : Cellule « en fleur » caractéristique de l'ATLL.....	88
Figure 29 : Modèle de développement d'une ATLL.....	90
Figure 30 : Modèles de l'effet néfaste de l'infection par le virus HTLV-1 sur le système nerveux central.....	97
Figure 31 : Représentation schématique des déséquilibres immunitaires induit par le virus HTLV-1	98
Figure 32 : Modèle de développement d'une TSP/HAM	99
Figure 33 : Tax et la voie PI3K/Akt.....	104
Figure 34 : Tax et les MAP kinases	106
Figure 35 : Structure protéique des facteurs NF- κ B et des inhibiteurs I κ B.....	107
Figure 36 : Tax et l'activation de NF- κ B.....	109
Figure 37 : Inhibition du NMD par Tax.....	117
Figure 38 : Tax active un réseau de voies interconnectées	118
Figure 39 : Dérégulation du cycle cellulaire par Tax	120
Figure 40 : Tax et inhibition des voies de réparation des dommages à l'ADN	125
Figure 41 : Tax et le point de contrôle G2/M du cycle.....	127
Figure 42 : Tax et inhibition de l'apoptose.....	130
Figure 43 : Schéma bilan récapitulant les principaux effets de Tax sur des processus cellulaires pouvant aboutir à l'immortalisation des cellules	133
Figure 44 : Les corps nucléaires Tax.....	134
Figure 45 : Diversité des corps nucléaires cellulaires	135
Figure 46 : Tax dans différents agrégats cytoplasmiques.....	140
Figure 47 : Schéma de la structure et des modifications post-traductionnelles de Tax.....	143
Figure 48 : La structure de l'ubiquitine et des chaînes d'ubiquitine.....	147
Figure 49 : Cycle de conjugaison à l'ubiquitine	149
Figure 50 : L'ubiquitine dans la voie NF- κ B.....	152
Figure 51 : Alignement des séquences protéiques de l'ubiquitine et des 4 SUMO chez l'Homme	158
Figure 52 : SUMOylation et activation de la voie NF- κ B en réponse au stress génotoxique	161
Figure 53 : Les lysines de Tax1 et Tax2B	166

Figure 54 : Modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax.....	169
Figure 55 : Organisation structurale des protéines TRAF	172
Figure 56 : TRAF5, un régulateur positif de l'ubiquitinylation de Tax.....	186
Figure 57 : TRAF2, un régulateur négatif de l'ubiquitinylation de Tax	187
Figure 58 : TRAF1, un autre régulateur négatif de l'ubiquitinylation de Tax.....	188
Figure 59 : TRAF2 et TRAF1 coopèrent pour inhiber l'ubiquitinylation de Tax.....	189
Figure 60 : TRAF5 favorise l'activation de la voie NF- κ B par Tax.....	190
Figure 61 : Effet de TRAF2 sur l'activation de la voie NF- κ B.....	191
Figure 62 : Les mutants du motif PxQxT de Tax.....	192
Figure 63 : Co-immunoprécipitation de Tax et Tax muté avec TRAF1.....	193
Figure 64 : Ubiquitinylation et SUMOylation des mutants de Tax dans le motif PxQxT	194
Figure 65 : Pourcentage de modification de Tax sauvage ou muté dans les cellules.....	196
Figure 66 : Caractérisation de l'ubiquitinylation de Tax et Tax-P79AQ81A.....	197
Figure 67 : Caractérisation de la SUMOylation de Tax et Tax-P79AQ81A	198
Figure 68 : Localisations subcellulaires caractéristiques de la protéine Tax	199
Figure 69 : Localisation subcellulaire de Tax et Tax-P79AQ81A	202
Figure 70 : Tax et Tax-P79AQ81A interagissent avec le complexe IKK	204
Figure 71 : Tax et Tax-P79AQ81A relocalisent NEMO.....	205
Figure 72 : Tax et Tax-P79AQ81A activent la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B.....	207
Figure 73 : Tax et Tax-P79AQ81A transactivent les promoteurs à éléments de réponse κ B dans les cellules adhérentes	208
Figure 74 : Tax et Tax-P79AQ81A transactivent les promoteurs à éléments de réponse κ B dans des cellules T.....	210
Figure 75 : Les corps nucléaires sont quasiment absents des cellules chroniquement infectées par HTLV-1	212
Figure 76 : Représentation schématique de Tax-His et de ses mutants.....	213
Figure 77 : Ubiquitinylation et SUMOylation des mutants de Tax.....	214
Figure 78 : Corrélations entre ubiquitinylation de Tax et activation du complexe IKK.....	216
Figure 79 : Activation de promoteurs dépendants de NF- κ B et CREB par différents mutants de Tax dans les CEM.....	218
Figure 80 : Corrélation entre ubiquitinylation de Tax et activation de la voie NF- κ B	219

Figure 81 : La fusion de SUMO1 a Tax favorise la formation de corps nucléaires mais sans recrutement de RelA	222
Figure 82 : La fusion de SUMO1 stabilise Tax dans le cytosol	224
Figure 83 : La fusion de SUMO1 augmente l'ubiquitinylation de Tax-P79AQ81A et sa capacité à transactiver les promoteurs à éléments de réponse κ B	225
Figure 84 : Représentation schématique de Tax1-His, Tax2-His et leurs mutants	227
Figure 85 : Ubiquitinylation et SUMOylation de Tax2	228
Figure 86 : Localisation subcellulaire de Tax2.....	229
Figure 87 : Tax2 interagit et relocalise NEMO indépendamment de l'ubiquitine	231
Figure 88 : Tax2 active la transcription d'un promoteur à éléments de réponse κ B indépendamment de l'ubiquitine	232
Figure 89 : Nouveaux modèles d'activation de la voie NF- κ B par Tax1 et Tax2	265

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Voies de transmission du virus HTLV et stratégies de prévention associées.....	44
Tableau 2 : Comparaison des protéines régulatrices et auxiliaires des virus HTLV-1 et HTLV-2	52
Tableau 3 : Comparaison des 4 formes cliniques d'ATLL	86
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des propriétés de Tax et de ses mutants	220

INTRODUCTION

Les virus sont une des premières causes de cancer dans le monde. En analysant les données obtenues sur l'année 2002, Donald M. Parkin a montré que 1,9 millions de cancers, soit 17,8% des cas de cancers dans le monde étaient dus à des infections (Parkin, 2006). La majorité de ces infections est d'origine virale (12,1% sur les 18%) (**Figure 1A**). En effet, un certain nombre de virus ont été associés au développement de cancers chez l'Homme : virus d'Epstein-Barr (lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin, carcinome nasopharyngé), virus de l'hépatite B et C (carcinome hépato-cellulaire), herpesvirus humain de type 8 (sarcome de Kaposi, lymphome primitif des séreuses, maladie de Castelman), papillomavirus humains (cancer du col de l'utérus, cancer de la bouche, de l'oropharynx, du larynx et de l'œsophage, cancer de la peau) et virus T lymphotrope humain de type 1 ou HTLV-1 (*Human T-cell Lymphotropic Virus type 1*) (leucémie à cellules T de l'adulte) (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). Il est à noter que l'origine virale des cancers est beaucoup plus importante dans les pays en voie de développement que dans les pays développés (**Figure 1B**), ce qui est corrélé avec de plus fortes prévalences d'infection par ces différents virus dans ces régions.

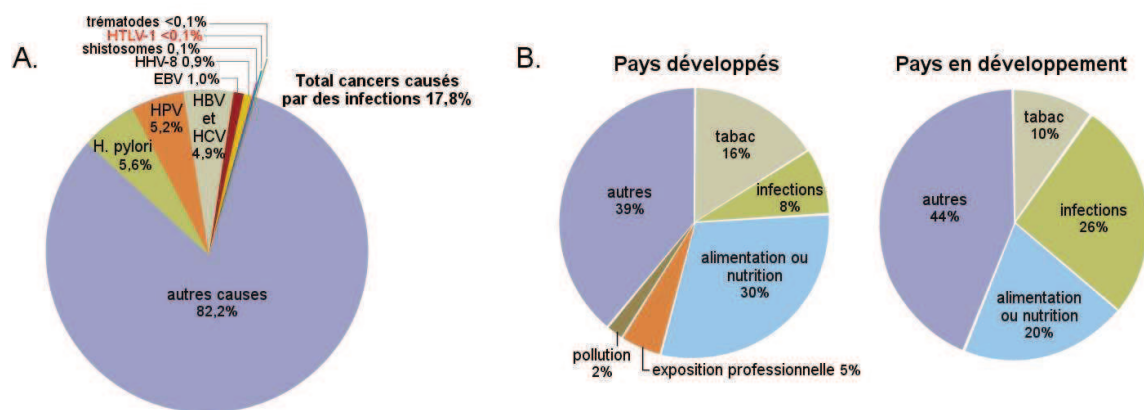


FIGURE 1 : REPARTITION DES CAUSES DE CANCER. ADAPTE DE (MACKAY ET AL., 2006).

A. Les infections représentent près de 18% des causes de cancer. Les virus représentent la majorité de ces causes d'infection (12,1%) même si des bactéries (*Helicobacter pylori*) et des parasites sont aussi impliqués.

B. Les cancers d'origine infectieuse sont beaucoup plus nombreux dans les pays en voie de développement, où la prévalence des agents pathogènes impliqués est plus élevée, que dans les pays développés.

Le cancer et les virus ont un long passé commun (pour revue (Javier and Butel, 2008)). En effet, les virus ont permis de grandes avancées dans le domaine de la cancérologie, aussi bien en permettant l'identification d'une cause étiologique du cancer, qu'en permettant de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'œuvre lors des processus de

transformation. Les mécanismes identifiés dans le cas de cellules transformées par des virus ont pu être élargis à des cancers induits par d'autres types de carcinogènes (chimiques, radiations...). C'est notamment grâce à l'étude des tumeurs viro-induites que les oncogènes aussi bien viraux que cellulaires, ainsi que les gènes suppresseurs de tumeur ont pu être découverts (pour revue (Butel, 2000)). Le virus HTLV-1 fait partie de ces virus qui ont, et continuent à beaucoup apporter à la compréhension des processus de transformation cellulaire.

L'objectif de notre laboratoire est justement d'améliorer la compréhension de ces processus. Avant de présenter nos résultats à proprement parler, nous allons décrire les différents virus HTLV à travers le monde. Puis il sera nécessaire de présenter ce que l'on sait actuellement de la biologie cellulaire de l'infection par le virus HTLV-1 et des pathologies induites par ce virus. Nous indiquerons également les différences pertinentes qui peuvent exister entre les virus HTLV-1 et HTLV-2. Enfin, nous nous intéresserons plus en détail aux rôles de la protéine régulatrice Tax du virus HTLV-1 dans les différents processus menant à la transformation des cellules, en particulier l'activation constitutive de la voie NF- κ B.

I. LES VIRUS HTLV

Revenons sur les événements majeurs qui ont amené à la découverte du premier rétrovirus humain, le virus HTLV-1, qui reste encore aujourd'hui le seul rétrovirus humain oncogène jamais identifié. L'histoire de sa découverte est intimement liée à l'histoire de la découverte des premiers virus oncogènes, chez l'animal d'abord, puis chez l'Homme.

A. HTLV, LE PREMIER RETROVIRUS HUMAIN : UNE HISTOIRE DE DECOUVERTES

Alors que le cancer est une maladie connue depuis l'Antiquité et dont des traces ont même été retrouvées sur des restes d'Hominidés datant de 4 millions d'années par Louis Leakey en 1932 (Mackay et al., 2006), de nombreuses théories tentant d'élucider la nature et l'origine des tumeurs se sont succédées : d'Hippocrate aux alentours de 400 avant Jésus-Christ qui formula la "théorie des humeurs", à la "théorie de la lymphe" émise par Frederick Hoffman et George Stahl. Ce n'est qu'au XIXe siècle que toutes ces théories seront remplacées par la théorie moderne du cancer qui établit que le cancer est une maladie des

cellules et non pas de la lymphe comme l'ont montré Johannes Müller, Rudolf Virchow et Karl von Rokitansky. Reste à identifier les causes de cette maladie. Or cette époque correspond également au développement de la microbiologie et certaines expériences semblent impliquer des bactéries, levures, champignons et autres micro-organismes dans le développement des cancers. Cependant, l'absence d'une démonstration rigoureuse a entraîné l'acceptation d'un dogme selon lequel le cancer n'a pas d'origine infectieuse. Il va falloir attendre la fin du XIXe siècle et la découverte d'un nouvel agent infectieux, le virus, pour voir ce dogme évoluer. Cette découverte est attribuée à Dimitrii Ivanofsky qui démontre que l'agent responsable de la mosaïque du tabac est ultrafiltrable sur le filtre de Chamberland et à Martinus Beijerinck qui démontre que cet agent ne peut pas se multiplier en absence de cellules, contrairement aux autres micro-organismes connus jusqu'à présent, mais peut être transmis de plante en plante et donc se multiplier dans des tissus vivants, contrairement à une toxine. Rapidement, d'autres virus sont identifiés et commencent à être associés au développement de certaines tumeurs. C'est en 1911 que Peyton Rous va découvrir le premier virus oncogène, le virus du sarcome de Rous (RSV) induisant un sarcome chez le poulet (Rous, 1911). Cette découverte va permettre une première remise en cause du dogme existant et permettre la reconnaissance des virus comme une étiologie possible des cancers, même si la majorité de la communauté scientifique reste sceptique. Pourtant, déjà avant lui, en 1907, Giuseppe Ciuffo avait montré que, chez l'Homme, les verrues peuvent être transmises via des ultrafiltrats de ces lésions, ce qui sous-tendait déjà une origine virale (Ciuffo, 1907). Cependant, les papillomavirus que l'on sait aujourd'hui à l'origine de ces verrues, ne seront découverts que 70 ans plus tard, n'accordant que peu d'impact à cette découverte de G. Ciuffo. De même, Vilhelm Ellerman et Olaf Bang ont décrit en 1908 un autre agent ultrafiltrable, le virus de la leucémie aviaire (ALV), qui, inoculé à des poulets sains, induisait le développement de leucémies (Ellermann and Bang, 1908). La leucémie n'étant pas reconnue en tant que cancer à cette époque, il fallut attendre 40 ans avant que le virus ALV soit reconnu en tant que virus oncogène. Après la découverte de P. Rous et malgré le scepticisme régnant sur la possible origine virale des cancers, d'autres virus oncogènes ont continué à être découverts, d'abord chez l'animal puis chez l'Homme. Ainsi, alors que le virus du sarcome de Rous était un virus à génome ARN, le *Cottontail rabbit papillomavirus* (CPRV) fut le premier virus oncogène à génome ADN découvert en 1935 chez le lapin, toujours par Peyton Rous mais associé à Joseph Beard (Rous and Beard, 1935). Puis

le premier virus de la leucémie murine fut découvert chez la souris en 1951 par Ludwik Gross (Gross, 1951). Avec la découverte de virus oncogènes de plus en plus nombreux, l'idée que des virus pouvaient être une cause étiologique des cancers fut acceptée et la recherche de tels virus chez l'Homme s'est intensifiée. Le premier virus oncogène humain, le virus d'Epstein-Barr, fut donc identifié et visualisé en microscopie électronique en 1965 par l'équipe de Tony Epstein et Yvonne Barr dans des lignées de cellules dérivées de lymphomes de Burkitt alors même que Denis Burkitt avait précédemment évoqué l'idée d'une origine virale pour ce lymphome (Epstein et al., 1965). Puis d'autres virus furent liés à des cancers chez l'Homme. C'est le cas du virus de l'Hépatite B, associé au carcinome hépatocellulaire, qui est de ce fait le premier carcinogène humain (Blumberg et al., 1975), mais aussi les papillomavirus humains, notamment 16 et 18, qui sont aujourd'hui liés au développement d'environ 70% des cancers du col de l'utérus chez la femme (Boshart et al., 1984).

Sur le chemin de la découverte du virus HTLV, une avancée importante fut la caractérisation, en 1970, de la transcriptase inverse, enzyme permettant la synthèse d'ADN à partir d'ARN, de façon indépendante par Howard Temin et David Baltimore. Cette découverte confirma l'hypothèse du provirus, copie ADN d'un génome initialement ARN, qui s'intègre ensuite dans le génome cellulaire, émise par H. Temin quelques temps auparavant (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). De nombreux virus oncogènes animaux possédant un génome ARN se révélèrent ainsi appartenir au groupe des rétrovirus. Au contraire, aucun rétrovirus humain, oncogène ou non, n'avait jusqu'alors été mis en évidence, ce qui intensifia la recherche dans cette direction. Ainsi, dans les années 1970, plusieurs essais pour identifier un rétrovirus humain se révélèrent infructueux. Notamment, l'origine humaine du virus foamy isolé en 1971 à partir de cellules d'un carcinome nasopharyngé chez un patient du Kenya fit débat jusqu'en 1994 (Achong et al., 1971), date à laquelle le génome fut séquencé et se révéla être à 90% identique au virus foamy du chimpanzé (Herchenroder et al., 1994). Ainsi le virus foamy "humain" n'était en fait qu'un variant du virus de chimpanzé. De nombreuses autres publications rapportèrent l'identification de rétrovirus humains mais toutes se révélèrent être dues à des contaminations par des rétrovirus animaux au laboratoire ou à la détection de l'ADN polymérase γ . Comme la transcriptase inverse, cette polymérase est sensible au traitement à la ribonucléase puisqu'elle utilise l'ARN comme amorce mais pas comme matrice. Toutes ces déceptions ainsi que certains arguments scientifiques, tels que le fait que quand ils sont

présents chez l'animal, les rétrovirus sont faciles à détecter et le fait que les sérums humains sont capables de lyser les rétrovirus animaux, suggérant une protection de l'Homme face aux rétrovirus, ont fini par faire de nouveau régner le scepticisme dans la communauté scientifique sur l'existence de rétrovirus chez l'Homme.

De nouveau, il fallut des améliorations techniques pour finalement aboutir à la découverte du premier rétrovirus humain : le virus HTLV. D'une part, la détection et la caractérisation de l'activité de la transcriptase inverse, à la fois en terme de sensibilité et de discrimination entre enzymes virales et cellulaires, furent améliorées (Bobrow et al., 1972; Robert-Guroff and Gallo, 1977; Robert et al., 1972). D'autre part, de nombreux rétrovirus animaux étant associés à des leucémies, la recherche d'un rétrovirus humain s'est particulièrement focalisée sur ce type de maladie. La découverte d'un facteur de croissance des lymphocytes T, plus tard appelé Interleukine-2 ou IL-2, permit la culture de lymphocytes *in vitro* et facilita donc la recherche de rétrovirus dans ces cellules (Morgan et al., 1976). Grâce à ces nouveaux outils, Robert Gallo et son équipe purent isoler le premier rétrovirus humain en 1980 dans une lignée cellulaire (HUT-102) établie à partir des cellules tumorales d'un patient atteint de *Mycosis fungoides* ou lymphome cutané à cellules T et qui se révélera plus tard être un cas de leucémie à cellules T de l'adulte ou ATL (*Adult T-cell Leukemia*) (Poiesz et al., 1980). Cette lignée cellulaire, cultivée en présence d'IL-2 au départ, a eu la particularité de devenir indépendante de l'IL-2 pour sa croissance. De plus, des particules virales extracellulaires ou en train de bourgeonner à partir de ces cellules ont pu être observées en microscopie électronique (**Figure 2A**). Une activité de transcriptase inverse a été mise en évidence à partir des particules purifiées, confirmant le caractère rétroviral de ce virus. La morphologie des particules virales, leur profil protéique ainsi que l'activité de transcriptase inverse étaient différents des rétrovirus caractérisés jusqu'alors. De plus, la non reconnaissance de la transcriptase inverse de ce virus par aucun des anticorps dirigés contre les polymérases cellulaires ou virales connues ont permis de conclure à l'isolation d'un nouveau rétrovirus, qu'ils ont appelé HTLV pour *Human cutaneous T-cell Lymphoma Virus*. D'autres preuves suivirent avec la caractérisation des propriétés antigéniques et des séquences nucléotidiques du virus différentes des autres rétrovirus connus confirmant le caractère nouveau de ce rétrovirus (Kalyanaraman et al., 1981; Reitz et al., 1981). La détection d'anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes du rétrovirus HTLV dans le sérum du patient mais également dans le sérum d'un autre patient souffrant d'une leucémie

à cellules T confirma l'hypothèse d'un rétrovirus humain au détriment de l'hypothèse d'une contamination en laboratoire, comme ce fut de nombreuses fois le cas précédemment (Posner et al., 1981).

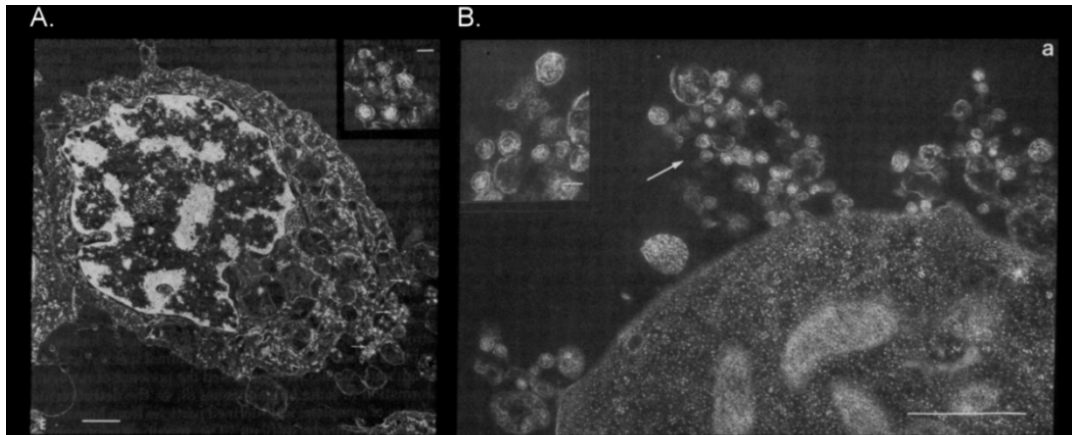


FIGURE 2 : PREMIERES OBSERVATIONS DU VIRUS HTLV-1 EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

A. Observation par une équipe américaine des particules virales du virus HTLV-1 produites par la lignée cellulaire HUT-102. D'après (Poiesz et al., 1980).

B. Observation par une équipe japonaise des particules virales du virus HTLV-1 produites par la lignée cellulaire MT-1. D'après (Hinuma et al., 1981).

En parallèle, les mêmes recherches sont effectuées au Japon mais sur des lignées cellulaires établies à partir de cellules de patients atteints d'ATL. Cette leucémie à cellules T de l'adulte a été décrite pour la première fois en 1977 par Kiyoshi Takatsuki et ses collègues (Uchiyama et al., 1977). Cette leucémie présentait plusieurs particularités, la principale étant l'origine géographique des patients. Alors que tous les patients de l'étude, soit 16, habitaient dans différentes grandes agglomérations de l'île d'Honshu, 13 d'entre eux étaient nés et avaient grandi sur l'île de Kyushu, et plus particulièrement dans la région de Kagoshima pour 8 d'entre eux. Cette origine géographique commune suggérait fortement une même étiologie pour tous ces cas d'ATL et une origine virale a été envisagée. Isao Miyoshi réussit à établir des lignées de cellules, MT-1, MT-2 et MT-4, dérivées de cellules ATL co-cultivées avec des lymphocytes de sang de cordon ombilical pour pallier au manque de lymphokines purifiées (Miyoshi et al., 1980). Après étude du caryotype, la lignée MT-2 se révéla en fait être dérivée des lymphocytes de sang de cordon, au départ sains et de genre opposé aux cellules ATL, ce qui constitue la première transmission du rétrovirus et la première immortalisation des cellules infectées *de novo*, ce qui ne sera expliqué que plus tard (Miyoshi et al., 1981). Suspectant déjà une origine virale, Yorio Hinuma et ses collègues utilisèrent l'immunofluorescence indirecte pour identifier des cellules qui réagissent aux

sérums de patients atteints d'ATL en se basant sur ce qui avait été montré pour le virus EBV : les personnes infectées par le virus possèdent des anticorps spécifiques du virus (Hinuma et al., 1981). Les seules lignées cellulaires qui donnèrent un signal significatif furent les lignées MT-1, MT-2 et MT-4 établies par I. Miyoshi. La lignée MT-1 servit ensuite à cribler les sérums de nombreux patients souffrant de différents types de leucémies. Il s'avéra que les anticorps spécifiques des antigènes présents dans les cellules MT-1 étaient présents chez tous les patients souffrant d'ATL et chez quelques personnes saines notamment dans les zones endémiques pour l'ATL. Cette observation suggérait fortement une origine virale à l'ATL et Y. Hinuma et ses collègues décrivirent d'ailleurs dans leur papier l'observation en microscopie électronique de particules virales dans les cellules MT-1 (**Figure 2B**).

Cependant, la caractérisation de ce virus en tant que rétrovirus ne fut publiée qu'en 1982 par Mitsuaki Yoshida et son équipe (Yoshida et al., 1982). Pour cela, ils utilisèrent des cellules MT-2 et détectèrent une activité de transcriptase inverse dans le surnageant de ces cellules même en l'absence de matrice ARN externe suggérant la présence d'ARN endogène et de transcriptase inverse dans des fractions à la même densité que des particules de rétrovirus animaux. L'ADN complémentaire ainsi obtenu permit de détecter le génome proviral intégré spécifiquement dans l'ADN des cellules MT-1 et MT-2. C'est ainsi que l'existence d'un nouveau rétrovirus fut également prouvée au Japon et appelé ATLTV pour *Adult T-cell Leukemia Virus*. Ce n'est qu'en 1984 que ces deux virus, HTLV et ATLTV, furent reconnus comme étant identiques par une étude de leur séquence et la dénomination HTLV fut adoptée (Watanabe et al., 1984).

La découverte du virus HTLV-1 a ouvert la voie à la découverte de nouveaux rétrovirus humains, le virus HTLV-2 d'abord, en 1982, isolé à partir de cellules d'un patient ayant une "leucémie T à tricholeucocytes" (Kalyanaraman et al., 1982), puis surtout le virus de l'immunodéficience humain de type 1 ou VIH-1 (Barre-Sinoussi et al., 1983).

Cependant la découverte de ce virus ne fut qu'une première étape. En effet, ce virus n'avait pas l'organisation des autres rétrovirus animaux connus, ne codant pas pour un oncogène dérivé d'un proto-oncogène cellulaire mais possédant dans la région 3' de son génome une région inconnue nommée alors pX en plus des gènes *Gag*, *Pol* et *Env* classiques. Les nombreuses études menées au cours des 30 dernières années ont permis de mieux comprendre ce virus et ses relations avec la cellule hôte, même si de nombreuses questions se posent encore aujourd'hui.

B. CLASSIFICATION DES VIRUS PTLV

A la suite du virus HTLV-1, d'autres rétrovirus HTLV ont été découverts ainsi que leurs équivalents simiens, les virus T lymphotropes simiens (STLV, *Simian T-cell Lymphotropic Virus*). Puisque les virus humains et simiens sont très proches au niveau de leur séquence, voire indiscernables phylogénétiquement, ils ont été regroupés sous le nom de virus T lymphotropes de primates (PTLV, *Primate T-cell Lymphotropic Virus*) (Watanabe et al., 1986).

1. LES VIRUS PTLV, DES RETROVIRUS UNIQUES EN LEUR GENRE

De par leurs caractéristiques, notamment leur capacité à intégrer une copie ADN de leur génome dans le génome de leur cellule hôte, les virus PTLV appartiennent à la famille des *Retroviridae* (Comité international de taxonomie des virus., 2011). Selon la classification établie par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) qui définit 7 genres au sein de la famille des *Retroviridae*, les virus PTLV appartiennent au genre des *Deltaretrovirus* au sein de la sous-famille des *Orthoretrovirinae* (Figure 3).

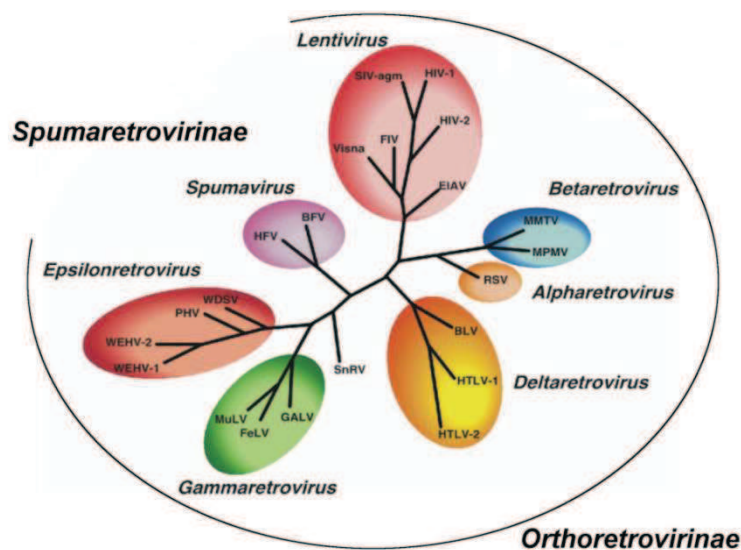


FIGURE 3 : CLASSIFICATION DES RETROVIRUS.

Analyse phylogénétique basée sur la comparaison de séquences conservées du gène codant la polymérase des rétrovirus. Cette comparaison de séquence permet de différencier 7 genres au sein de la famille *Retroviridae*, dont le genre *Deltaretrovirus* auquel appartiennent les PTLV. Ces 7 genres peuvent également être distingués par de nombreux autres critères : le génome complexe des virus PTLV les différencie des *Alpha-* et *Gammaretrovirus* dits "simples", ne codant que pour les protéines de structures et les enzymes présentes dans la particule virale. Grâce aux observations en microscopie électronique, il est également possible de distinguer les *Deltaretrovirus* présentant une particule virale de type C, une capsid sphérique et un bourgeonnement à la membrane plasmique, des *Betaretrovirus* qui sont de type B ou D des *Lentivirus* qui ont une capsid en bâton ou en cône tronqué et des *Spumavirus* qui bourgeonnent principalement au niveau du réticulum endoplasmique. Le dernier genre, *Epsilonretrovirus*, regroupe uniquement des rétrovirus de poissons. Adapté de (Comité international de taxonomie des virus., 2011).

Au sein du genre *Deltaretrovirus*, les virus HTLV et STLV ne partagent des propriétés communes qu'avec un autre rétrovirus animal, le virus de la leucémie bovine ou BLV. Ce virus a en fait été identifié et caractérisé, bien avant les virus HTLV, au début des années 1970 (Gilden et al., 1975). Le virus BLV est un virus oncogène B lymphotrope qui infecte les bovins et provoque des leucémies, des lymphomes ou des lymphosarcomes chez un faible pourcentage d'animaux infectés. En se basant sur la comparaison des séquences du gène *pol*, ce virus diverge des virus PTLV de type 1 et de type 2 de manière équivalente et assez conséquente (42,1% et 42,8%, respectivement) (Dube et al., 1997), d'où sa place au sein du genre *Deltaretrovirus* (**Figure 3**). Malgré cela et bien qu'il n'infecte pas les mêmes cellules que les virus PTLV, le virus BLV est, sur bien des points, comparable à ces virus : organisation du génome, modes de transmission, stratégies de multiplication, mécanismes de transformation... (pour revue (Rodriguez et al., 2011)). En particulier, les virus HTLV et BLV ont en commun une région caractéristique appelée pX en 3' de leur génome et qui code notamment pour un transactivateur viral, la protéine Tax (Rosen et al., 1986) (**Figure 12**). Le virus BLV sert donc de modèle animal pour mieux comprendre les virus HTLV.

2. LES PTLV : UN GROUPE PHYLOGENETIQUE BIEN IDENTIFIE

Alors que tous les PTLV possèdent un grand nombre de caractéristiques communes, plusieurs espèces virales peuvent quand même être distinguées, essentiellement en se basant sur leur séquence. Alors que les liens phylogénétiques entre des rétrovirus aussi différents que le rétrovirus de poisson WDSV et le virus HTLV-1 sont étudiés grâce à l'analyse de séquences conservées, essentiellement le gène *pol*, la taxonomie des virus au sein du genre *Deltaretrovirus* est établie en comparant des séquences plus variables, notamment les séquences répétées terminales des provirus ou LTR (*Long Terminal Repeat*) ou le gène *env*. Ainsi, l'arbre phylogénétique construit sur la base de l'ensemble des gènes *gag*, *pol*, *env* et *tax* permet d'observer 4 groupes bien distincts au sein des PTLV : PTLV-1 à PTLV-4 (**Figure 4**).

Dès 1982 des anticorps dirigés contre des antigènes du virus HTLV ont été mis en évidence dans les sérums de macaques au Japon (*Macaca fuscata*) (Miyoshi et al., 1982) puis chez différents singes d'Asie et d'Afrique. Une lignée cellulaire établie à partir de leucocytes de babouins (*Papio cynocephalus*) produisant des particules virales de type C et réagissant à des anticorps contre les antigènes du virus HTLV a permis d'identifier des séquences d'ADN

proches de celles du virus HTLV-1 (Guo et al., 1984). Ces virus furent appelés virus STLV-1. Des analyses de séquences ont déterminé une identité de séquence très importante entre les virus HTLV-1 et STLV-1, de l'ordre de 90% (Watanabe et al., 1985) et qui peut atteindre 97/98% entre certains HTLV-1 et STLV-1 sur certaines parties du génome (Mahieux et al., 1997). Ainsi toutes ces souches de HTLV-1 et STLV-1 forment un groupe phylogénétique bien identifiable : les PTLV-1 (**Figure 4**). Cependant, ces virus sont assez différents au niveau des pathologies induites. En effet, à ce jour, seulement une dizaine de cas de leucémies ou lymphomes T comparables aux pathologies lymphocytaires induites par le virus HTLV-1 ont été détectées chez les singes et aucun cas de myélopathie n'a été rapporté (Gessain, 2011).

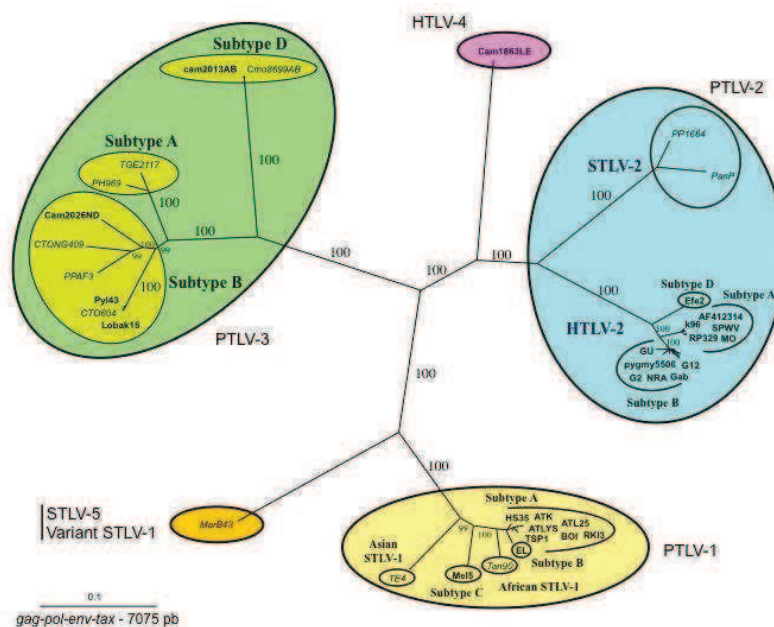


FIGURE 4 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES PTLV

Cet arbre a été construit à partir de l'analyse phylogénétique des séquences concatémériques gag-pol-env-tax de tous les PTLV disponibles dans les banques. Ces séquences se répartissent en 4 groupes bien distincts : PTLV-1, PTLV-2, PTLV-3 et PTLV-4. Les souches humaines sont inscrites en gras. Une souche avec une séquence très divergente des PTLV-1 est considérée par certains auteurs comme un STLV-5 (Liegeois et al., 2008). D'après (Mahieux and Gessain, 2011).

Les virus HTLV-2 sont phylogénétiquement distincts de ce groupe PTLV-1 puisque HTLV-2 ne présente qu'environ 70% d'homologie de séquence avec HTLV-1. Des virus STLV-2 ont également été découverts chez des bonobos (*Pan paniscus*) (Giri et al., 1994; Liu et al., 1994). De plus, alors que des virus STLV-1 ont été isolés dans de nombreuses espèces de singes, les virus STLV-2 n'ont pour l'instant été identifiés que chez les bonobos. Contrairement aux virus STLV-1, dont les séquences sont quasiment identiques aux séquences des virus HTLV-1, les virus STLV-2 divergent en moyenne de 25% des virus HTLV-2

sur l'ensemble de leur génome (Van Brussel et al., 1998). Les virus HTLV-2 et STLV-2 forment un groupe phylogénétique distinct des PTLV-1, les PTLV-2, même si les virus STLV-2 et HTLV-2 forment à l'intérieur de ce groupe deux clades phylogénétiques distinctes (**Figure 4**).

La première souche de STLV-3 a été découverte en 1994, chez des babouins hamadryas (*Papio hamadryas*) retenus en captivité. La séquence du provirus ne présentant que 40% et 38% d'homologie de séquence avec HTLV-1 et HTLV-2 respectivement, une nouvelle lignée de PTLV a été définie, les PTLV-3 (Goubau et al., 1994). Depuis, d'autres souches de STLV-3 ont été identifiées dans diverses espèces de singes d'Afrique centrale, de l'Ouest et de l'Est. Il a fallu attendre 2005 pour découvrir l'équivalent humain du STLV-3. Aujourd'hui, quatre souches de HTLV-3 ont été identifiées chez des chasseurs Camerounais (Calattini et al., 2009; Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005; Zheng et al., 2010). Les virus HTLV-3 et STLV-3 ont des séquences très proches, présentant 85% à 99% d'homologie de séquence en fonction des gènes (Calattini et al., 2006) d'où leur regroupement au sein du groupe des PTLV-3, positionné à égale distance des PTLV-1 et des PTLV-2 sur l'arbre phylogénétique (**Figure 4**).

Enfin, un quatrième type d'HTLV a été identifié chez l'Homme très récemment toujours chez un chasseur Camerounais (Wolfe et al., 2005). A l'heure actuelle, une seule souche d'HTLV-4 a été isolée et séquencée. La séquence nucléotidique du provirus présente 62 à 71% d'identité avec chacun des autres HTLV (-1, -2 et -3) précédemment décrits et se positionne donc à équidistance des autres groupes de PTLV sur l'arbre phylogénétique (Switzer et al., 2009) (**Figure 4**). Malgré la recherche assidue de l'équivalent simien du HTLV-4 chez de nombreux singes d'Afrique les efforts n'ont pour l'instant pas été récompensés et le groupe des PTLV-4 ne se résume donc pour l'instant qu'au virus humain HTLV-4.

3. LES VIRUS HTLV-1 ET HTLV-2 : DE FAIBLES VARIATIONS RICHES EN ENSEIGNEMENT

Au contraire des autres rétrovirus, les virus HTLV ont une faible variabilité intra- et inter-individus (Gessain et al., 1992). En effet, parmi les différentes souches de HTLV-1, on observe au maximum 9% de divergence entre les séquences du gène *env* (Koralnik et al., 1994), c'est-à-dire moins que la variabilité du virus VIH-1 au sein d'un seul individu. En faisant l'hypothèse que les mutations s'accumulent au sein de la séquence virale proportionnellement au temps d'évolution depuis la séparation d'avec l'ancêtre commun, il

est possible de calculer la vitesse d'évolution du virus. Ainsi, Yanagihara *et al.* ont estimé la vitesse d'évolution du virus HTLV-1 entre $0,4 \cdot 10^{-7}$ et $6,8 \cdot 10^{-7}$ substitutions de nucléotides par site et par an en se basant sur un consensus de séquences *gag*, *pol*, *env* et *pX* (Yanagihara *et al.*, 1995). De la même façon, le taux d'évolution du virus HTLV-2 a été estimé à $7,3 \cdot 10^{-7}$ - $1,7 \cdot 10^{-6}$ mutations par site et par an en se basant cette fois-ci sur les séquences des LTR (Vandamme *et al.*, 2000) (**Figure 5**). Que ce soit pour HTLV-1 ou pour HTLV-2, ce taux de mutations et la capacité à générer de la variabilité est beaucoup plus faible que pour les autres virus à génome ARN connus. Cette grande variabilité des virus ARN dépend notamment de leur enzyme de réplication du génome sans mécanisme de correction sur épreuve et donc beaucoup moins fidèles que les enzymes cellulaires. Au contraire, la grande stabilité génétique des virus HTLV est associée à leur mode de multiplication (Wattel *et al.*, 1995) comme décrit plus loin.

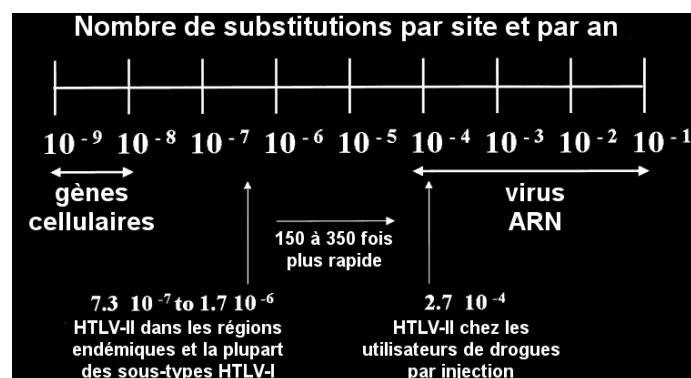


FIGURE 5 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES TAUX D'ÉVOLUTION DES VIRUS HTLV-1 ET HTLV-2

Les virus HTLV-1 et HTLV-2, bien que subissant des mutations plus rapidement que les gènes cellulaires, présentent des taux d'évolution (nombre de substitutions par site nucléotidique et par an) anormalement faibles pour des rétrovirus. Seul le taux d'évolution des virus HTLV-2 introduits récemment au sein de la population des utilisateurs de drogue par injection est beaucoup plus rapide que celui des virus HTLV-2 dans les régions endémiques et se rapproche des taux d'évolution classiques des virus à génome ARN. Adapté de (Vandamme *et al.*, 2000).

Bien que cette faible variabilité génétique empêche de retracer les transmissions entre individus, elle permet par contre de retracer les transmissions entre populations sur le long terme puisqu'il existe des variants moléculaires au sein des différentes espèces virales, HTLV-1 et HTLV-2 notamment. Ces variants peuvent être regroupés au sein de sous-types bien identifiés et sont le plus souvent bien séparés géographiquement. Ainsi, l'étude de la phylogénie interne des groupes HTLV-1 et HTLV-2 permet à la fois de mieux comprendre l'origine et l'évolution des virus HTLV mais aussi de mieux comprendre les interactions et les migrations humaines au cours du temps.

a) Les virus HTLV-1 et STLV-1 : leçons d'Histoire et de Géographie

Parmi les virus HTLV-1, il existe 7 sous-types moléculaires dont 4 majoritaires (Gessain, 2011). Ces sous-types moléculaires divergent depuis environ 20 000 ans et sont aujourd'hui associés à une localisation géographique particulière (Van Dooren et al., 2001) (**Figure 6**).

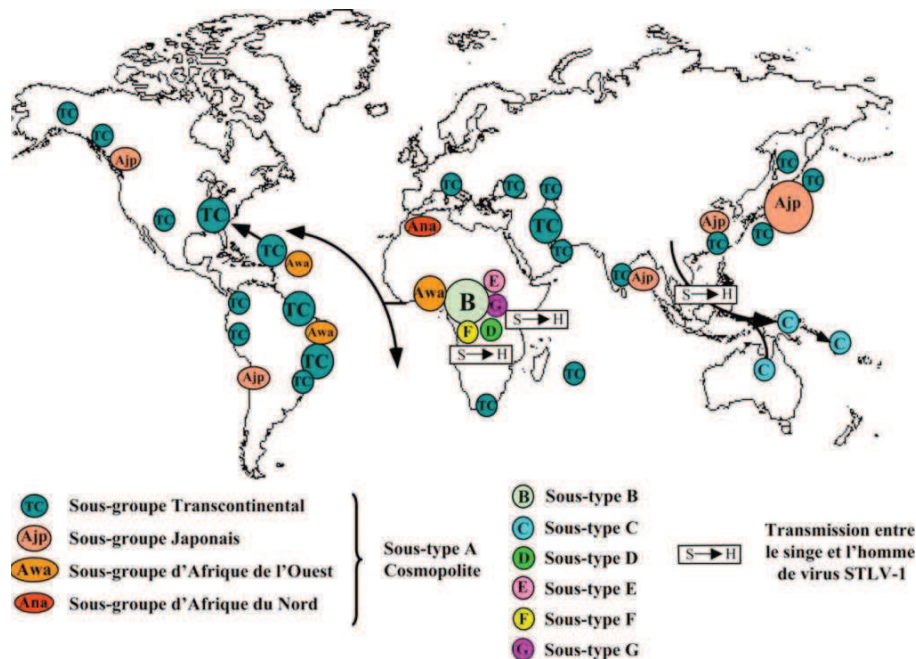


FIGURE 6 : REPARTITION PHYLOGENETIQUE ET GEOGRAPHIQUE DES SOUS-TYPES D'HTLV-1

Répartition géographique des différents sous-types moléculaires du virus HTLV-1 (A à G). Chaque sous-type a une localisation géographique propre sauf le sous-type A qui est retrouvé partout dans le monde. Les très probables transmissions entre le singe et l'Homme sont également représentées par des petites flèches ainsi que les migrations humaines à l'origine de la dissémination du virus par des grandes flèches. D'après (Gessain, 2011).

Le sous-type A, aussi appelé sous-type Cosmopolite, est le sous-type majoritairement retrouvé parmi les personnes infectées par le virus HTLV-1 dans le monde entier. Contrairement aux autres sous-types, le sous-type A est géographiquement très dispersé : il est présent au Japon, en Amérique, dans les Caraïbes, en Afrique, au Moyen-Orient, en Inde et dans certaines îles de l'Océan Pacifique (**Figure 6**). De plus, c'est le seul sous-type présent en Europe. Bien que géographiquement très éloignées, l'ensemble des souches composant le sous-type A sont très peu divergentes. Cependant avec une analyse plus précise, 4 sous-groupes moléculaires peuvent être identifiés au sein du sous-type A avec cette fois-ci une origine géographique commune au sein d'un même sous-groupe (Gessain, 2011). Plusieurs explications ont été avancées sur cette répartition géographique particulière du sous-type A : les migrations mongoloïdes durant le paléolithique, propageant le virus à travers le

Japon, l'Amérique du Nord puis l'Amérique du Sud (Miura et al., 1994), les explorateurs Européens il y a environ 500 ans propageant le virus vers le Japon et le continent Américain (Saksena et al., 1992), le commerce des esclaves au XVI^e siècle pour expliquer un passage du continent Africain vers les Caraïbes et l'Afrique du Sud (Gessain et al., 1992). Dans tous les cas, cette répartition particulière du sous-type A repose sur d'anciennes migrations humaines de grande ampleur et l'étude phylogénétique de ces souches virales permet aussi d'en apprendre plus sur ces migrations.

Le sous-type B est un sous-type d'Afrique centrale (**Figure 6**). Plusieurs souches de ce sous-type ont été identifiées dans différents pays d'Afrique centrale (Zaire, Gabon, Cameroun...) avec des géotypes bien distincts en fonction de l'origine géographique des souches (Gessain, 2011).

Le sous-type C ou sous-type Mélanésien regroupe des souches isolées en Papouasie Nouvelle-Guinée, dans les îles Salomon et Vanuatu ainsi que chez des Aborigènes d'Australie, confirmant une origine géographique bien définie de ce sous-type (**Figure 6**) (Gessain, 2011). Ce sous-type est le plus divergent des autres sous-types de HTLV-1 avec environ 9% de divergence par rapport au sous-type A dans le LTR (Mahieux et al., 1997).

Le sous-type D regroupe une minorité de souches d'Afrique centrale par rapport au sous-type B (**Figure 6**). Des souches virales ont notamment été isolées chez deux Pygmées de la partie Ouest de l'Afrique centrale.

Enfin, les sous-types E, F et G contiennent à l'heure actuelle un petit nombre de souches dont les géotypes sont bien distincts les uns des autres mais aussi des autres sous-types décrits précédemment. Ces trois sous-types ont une localisation géographique restreinte et bien identifiée : l'Afrique centrale (Gessain, 2011) (**Figure 6**).

La classification de l'ensemble des souches du virus HTLV-1 avec les nombreuses souches du virus STLV-1 identifiées montre qu'il est impossible de distinguer les souches du virus HTLV-1 des souches du virus STLV-1 phylogénétiquement. Ainsi, dans les arbres phylogénétiques, les souches les plus proches de chaque sous-type d'HTLV-1 ne sont pas des souches HTLV-1 d'autres sous-types mais des souches de STLV-1 proches géographiquement. C'est pour cette raison que la dénomination PTLV-1 a été adoptée pour désigner ces virus HTLV-1 et STLV-1 ne formant qu'un seul et même groupe monophylétique (Watanabe et al., 1986). Cette organisation phylogénétique suggère fortement des épisodes répétés de transmission inter-espèce entre les singes et les Hommes présents au sein d'une même

région géographique qui seraient à l'origine des différents sous-types moléculaires de HTLV-1 (Slattery et al., 1999). Seul le sous-type A ne forme pas de groupe monophylétique clair avec des équivalents simiens et pourrait donc être issu d'un autre sous-type d'HTLV-1 préexistant. Ceci semble confirmé par la faible diversité génétique existant entre les souches, suggérant une apparition récente de ce sous-type (Slattery et al., 1999).

En conclusion, l'organisation phylogénétique actuelle résulte de plusieurs événements : transmission de virus STLV-1 entre singes, d'où de fortes homologues de séquence entre des souches de STLV-1 isolées chez des espèces de singe différentes ; transmission inter-espèce du virus STLV-1 aux Hommes, principalement suite à des morsures profondes par un animal ou dépeçage d'un animal chassé avec des coupures accidentelles, puisque la consommation de "viande de brousse" est très répandue en Afrique centrale, et donc dans les deux cas passage de sang contenant des cellules infectées ; persistance de ce virus dans les populations humaines isolées sans réinfection par d'autres STLV-1 ; enfin, distribution globale et récente du virus HTLV-1 par le biais des grandes migrations humaines et notamment de populations infectées par le virus HTLV-1 (Gessain, 2011).

Une autre question importante trouve également sa réponse dans les analyses phylogénétiques, celle de l'origine du virus HTLV-1, mais cette fois-ci au niveau géographique. Il apparaît clairement que les souches asiatiques de HTLV-1, notamment les souches du sous-type C Mélanésien, mais aussi de STLV-1, sont les plus divergentes de l'ensemble des autres souches. Ainsi, l'ancêtre commun des virus de type 1 semble avoir émergé en Asie (Slattery et al., 1999). Cependant, le fait que l'Afrique soit le seul continent où tous les virus HTLV et STLV sont actuellement présents suggère une origine africaine pour l'ancêtre commun de tous ces PTLV (Vandamme et al., 1998). Il est possible grâce à toutes les études phylogénétiques de retracer l'évolution et les migrations du virus HTLV-1 depuis son origine. A partir d'Afrique et plus précisément d'Afrique de l'Est, origine géographique probable des PTLV, les virus STLV sont arrivés en Asie suite à des migrations simiennes. C'est en Asie qu'est apparue la lignée STLV-1 qui est ensuite passée chez l'Homme lors de leur migration vers la Mélanésie, donnant naissance au sous-type C du virus HTLV-1. Pendant ce temps, il est à noter que les virus STLV restés en Afrique ont évolué pour donner les PTLV-2 et PTLV-3. Beaucoup plus tard, des virus STLV-1 sont revenus en Afrique toujours via des migrations de singes et se sont ensuite disséminés parmi différentes espèces de primates non-humains. Plusieurs épisodes de transmissions inter-espèces ont ensuite permis

l'émergence des différents sous-types d'HTLV-1. Enfin, le sous-type A a été disséminé à travers le monde entier par le biais des grandes migrations humaines à partir du XVI^e siècle (**Figure 7**) (Vandamme et al., 1998).

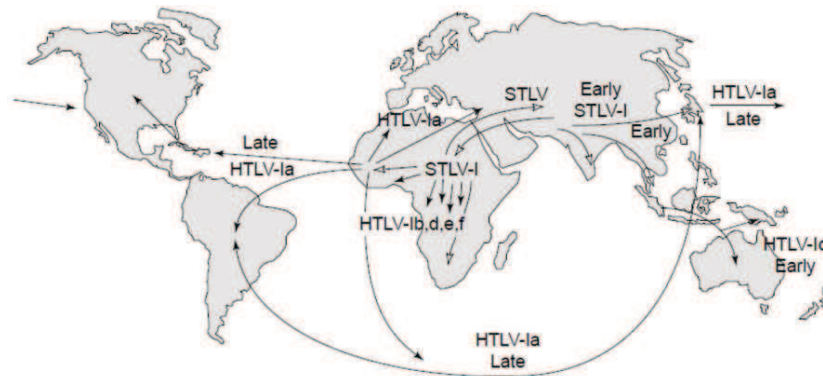


FIGURE 7 : MODELE DE L'ORIGINE ET DE LA DISSEMINATION DES VIRUS HTLV-1.

Les flèches à pointe pleine représentent les migrations des populations infectées par HTLV-1 alors que les flèches à pointe vide représentent les migrations des singes infectés par le virus STLV-1. "Early" indique des migrations précoces dites pré-colombiennes (avant le XVI^e siècle) et "Late" indique des migrations tardives à partir du XVI^e siècle. D'après (Vandamme et al., 1998).

b) Les virus HTLV-2 : des virus à deux vitesses

Tout comme pour le virus HTLV-1, il existe différentes souches de virus HTLV-2 qui peuvent être regroupées en trois sous-types : A, B et D (**Figure 8**). Il est à noter qu'un autre sous-type avait été préalablement décrit, le sous-type C, mais a finalement été rattaché au sous-type A (Salemi et al., 1999b). Cependant, la classification phylogénétique des souches du virus HTLV-2 est complètement différente de celle du virus HTLV-1 décrite précédemment.

Tout d'abord, alors qu'il est possible d'associer la plupart des sous-types du virus HTLV-1 avec une localisation géographique particulière, ce n'est pas le cas pour les sous-types du virus HTLV-2. En effet, les sous-types A et B rassemblent des souches virales isolées aussi bien en Afrique, qu'en Asie, en Europe ou en Amérique (**Figure 8**). Seul le sous-type D est présent uniquement chez des Pygmées Efe en République Démocratique du Congo. Ce sous-type D est le plus divergent par rapport aux sous-types A et B (**Figure 8**). De plus, les virus STLV-2, identifiés uniquement chez des Bonobos non loin du village des Pygmées Efe, forment un lignage séparé des virus HTLV-2, contrairement à ce que l'on a pu observer pour les virus de type 1. Cela suggère que l'origine des HTLV-2 se situe en Afrique centrale. A partir d'Afrique, le virus s'est ensuite propagé à travers l'Asie puis l'Amérique lors du passage du détroit de Béring par des populations infectées pour atteindre finalement les tribus

C. LES VIRUS HTLV-1 ET HTLV-2 DANS LE MONDE ACTUEL : ÉPIDÉMIOLOGIE

Même s'il est important de comprendre le passé des virus HTLV, riche en enseignements à la fois sur les virus et sur leurs hôtes, il est encore plus important de connaître parfaitement sa présence actuelle dans le monde et la façon dont il se répand pour pouvoir mieux enrayer sa transmission.

Afin de détecter la présence des virus chez un individu, nous disposons aujourd'hui de tests efficaces. Ils reposent le plus souvent sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les protéines virales par ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) puis confirmée par immunoblot. Les composants viraux peuvent également être mis directement en évidence par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou microscopie à immunofluorescence ou électronique (pour revue (Gessain, 2011)).

1. LA PREVALENCE DES VIRUS HTLV DANS LE MONDE

a) Le virus HTLV-1 : pas de juste milieu

On estime aujourd'hui que 10 à 20 millions de personnes dans le monde sont séropositives et donc infectées par le virus HTLV-1 (de The and Bomford, 1993). Cependant, ce virus n'est pas présent de façon ubiquitaire dans le monde mais réparti dans différentes régions d'endémie. En effet, il existe des foyers de très forte séroprévalence (plus de 5% de personnes infectées), le plus souvent entourés de régions de moyenne (entre 1% et 5 %) ou faible prévalence (moins de 1% de la population infectée) (**Figure 9**) (Goncalves et al., 2010). Cette répartition particulière en foyers géographiques ou ethniques est caractéristique de l'infection par le virus HTLV-1 et pourrait refléter un effet fondateur initial dans une population particulière, avec par la suite une transmission efficace liée à des conditions environnementales et/ou socio-culturelles favorables. Cette hypothèse est renforcée par l'observation suivante : parmi les populations qui émigrent de régions endémiques vers des régions non endémiques, la séroprévalence diminue dans les générations suivantes (Proietti et al., 2005).

Les principales régions de forte prévalence sont le sud du Japon, l'Afrique subsaharienne, les îles Caraïbes, l'Amérique centrale et du Sud ainsi que certaines zones restreintes de Mélanésie et du Moyen-Orient (**Figure 9**). Au sein d'un même pays, la

prévalence peut être très variable. C'est le cas au Japon, région d'endémicité la plus importante dans le monde, où la séroprévalence très importante dans certaines régions (jusqu'à 37% dans certaines populations du sud-ouest du Japon) cohabite avec des zones où le virus est absent (Goncalves et al., 2010). D'autres pays d'Asie, tels que Taïwan, l'Iran ou une province de Chine à proximité de Taïwan, présentent des prévalences du virus HTLV-1 modérées (0,1%-1%). Le virus HTLV-1 semble rare dans les autres pays d'Asie même si les informations manquent pour un certain nombre de pays (Verdonck et al., 2007). En Afrique, la prévalence augmente du nord au sud. La prévalence est faible dans des pays tels que le Maroc (0,6%) alors qu'elle est beaucoup plus élevée dans les pays d'Afrique sub-saharienne (jusqu'à 5% dans des pays tels que le Bénin, le Cameroun ou la Guinée-Bissau) (Goncalves et al., 2010). En Amérique du Sud, le virus HTLV-1 est présent dans quasiment tous les pays avec des variations importantes qui ont été associées à des changements de latitude et d'altitude (Goncalves et al., 2010). Enfin, il est intéressant de constater qu'en Australie, bien que la prévalence soit faible dans la population générale, il existe un foyer de très forte prévalence parmi les aborigènes (14%) (Goncalves et al., 2010). En Amérique du Nord et en Europe, la présence du virus est limitée à des groupes à risques, utilisateurs de drogues par injection ou personnes émigrant des régions d'endémie, même si le virus semble plus présent dans certains pays d'Europe de l'Est comme la Roumanie (Verdonck et al., 2007). Ainsi, la prévalence du virus HTLV-1 en France est estimée à 0,039% (Goncalves et al., 2010).

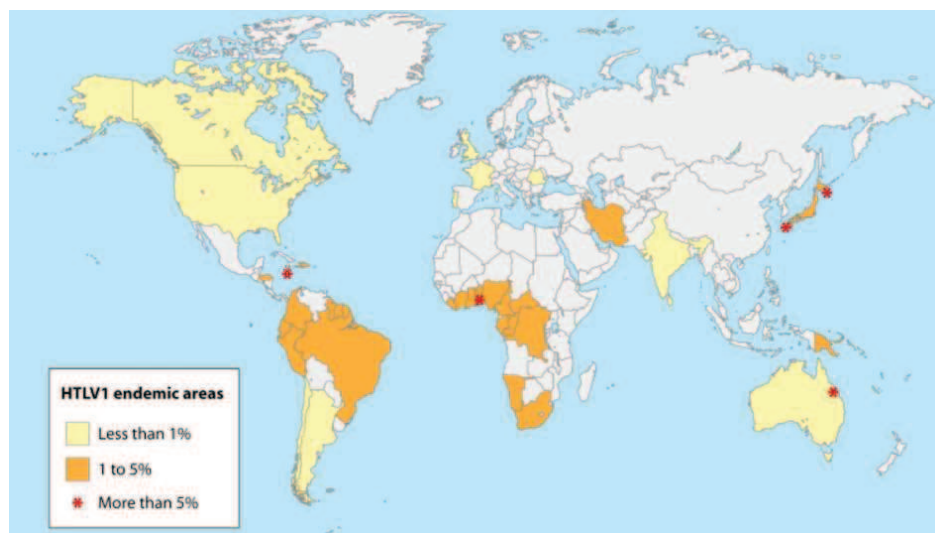


FIGURE 9 : PREVALENCE DU VIRUS HTLV-1 DANS LE MONDE

Les étoiles représentent les foyers de forte prévalence (plus de 5% de la population infectée). Les régions endémiques où la prévalence du virus HTLV-1 est moyenne (orange) et faible (jaune) sont également représentées. Les régions endémiques ne correspondent pas forcément aux pays colorés dans leur ensemble mais à certaines régions bien spécifiques de ces pays. D'après (Goncalves et al., 2010).

Outre une variabilité géographique très importante de la prévalence, cette dernière varie également en fonction de l'âge et du sexe des populations étudiées. En effet, la prévalence du virus HTLV-1 augmente de façon générale avec l'âge et est également plus importante chez les femmes que chez les hommes (Verdonck et al., 2007).

Cependant toutes ces estimations reposent majoritairement sur la détection de la séropositivité non pas dans la population générale mais parmi les donneurs de sang, les patients hospitalisés ou les femmes enceintes. Ces tests dans toutes ces populations particulières induisent un biais. Les données obtenues à partir des donneurs de sang sont probablement sous-estimées puisque les personnes à risques sont majoritairement exclues des donneurs de sang. Les tests réalisés dans les hôpitaux, le sont le plus souvent chez des patients souffrant de maladies (lymphomes, leucémies...) et donc plus susceptibles d'être infectés par le virus HTLV-1. Enfin, la prévalence étant plus importante chez les femmes que chez les hommes, la prévalence obtenue chez les femmes enceintes ne peut pas refléter la prévalence dans la population totale. Des études ciblant la population générale doivent donc être menées pour établir la prévalence réelle dans les régions endémiques. De même, l'estimation du nombre de personnes infectées par HTLV-1 dans le monde (10-20 millions) a maintenant été réalisée il y a une vingtaine d'années en se basant sur des prévalences biaisées, comme nous venons de le dire. De plus, les tests sérologiques à l'époque étaient très peu spécifiques et permettaient difficilement de différencier les infections par HTLV-1 et HTLV-2 (Hlela et al., 2009). Cette estimation doit donc être réévaluée en prenant en compte l'augmentation importante de la population mondiale.

b) HTLV-2 : un virus à deux visages

Le virus HTLV-2 est endémique principalement dans des tribus d'Amérindiens et de Pygmées en Afrique mais est également très présent chez les utilisateurs de drogues par injection. Même s'il est difficile de connaître précisément le nombre de personnes infectées par ce virus dans le monde, on peut estimer qu'il est de l'ordre de plusieurs millions (Roucoux and Murphy, 2004).

L'Amérique du Sud regroupe la majorité des foyers d'endémie. Tout comme pour le virus HTLV-1, la prévalence du virus est très variable, allant de 1% à 58% parmi les tribus indiennes autochtones, notamment au Brésil et en Amazonie. En Amérique centrale, des

études ont permis d'estimer la séroprévalence entre 8 et 10%. La séroprévalence est également importante dans les tribus indiennes d'Amérique du Nord (2 à 13%).

Outre les tribus Amérindiennes, le virus HTLV-2 est également très présent chez les utilisateurs de drogues par injection dans le monde entier. Ainsi, aux Etats-Unis, la prévalence du virus HTLV-2 dans cette population particulière est estimée à 20%. Ce virus est également très présent parmi les utilisateurs de drogues par injection européens, notamment en Italie et en Espagne. Il faut noter qu'une prévalence de 60% a été rapportée chez les toxicomanes du Vietnam du Sud (Roucoux and Murphy, 2004).

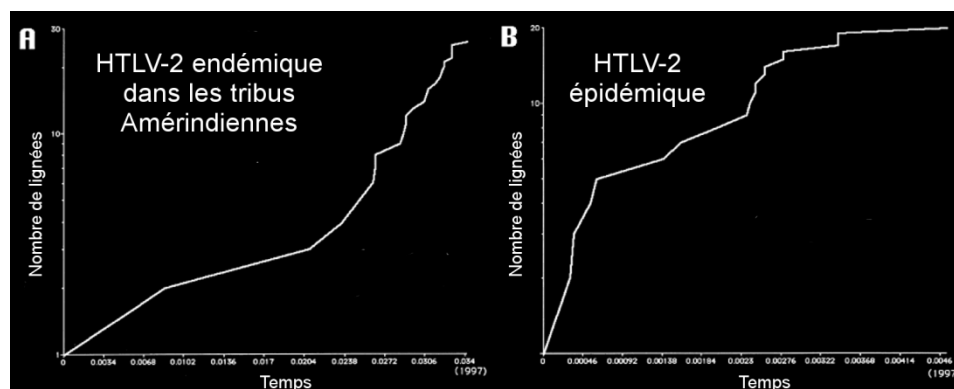


FIGURE 10 : LE VIRUS HTLV-2 ENDEMIQUE OU EPIDEMIQUE

Le nombre de lignées qui apparaissent dans l'arbre phylogénétique au cours du temps est rapporté sur un graphique. Adapté de (Vandamme et al., 2000).

A. La courbure positive indique que le nombre de nouvelles souches identifiées dans les tribus d'Indiens d'Amérique augmente de façon constante dans le temps, reflétant le caractère endémique du virus dans ces populations.

B. La courbure négative indique que le nombre de nouvelles souches augmente de façon exponentielle chez les utilisateurs de drogues par injection, révélant une propagation épidémique du virus dans cette population.

Alors que le virus HTLV-2 a des caractéristiques épidémiologiques très proches du virus HTLV-1 dans les populations Amérindiennes, il présente une dynamique très différente parmi les utilisateurs de drogues par injection (**Figure 10**) (Vandamme et al., 2000). Le virus HTLV-2 a donc changé de comportement lors de son passage dans une nouvelle population. Il est devenu épidémique, alors que les autres virus HTLV sont endémiques, et son taux de mutations a augmenté (cf I-B-3-b). Dans cette nouvelle population des utilisateurs de drogues par injection, le virus HTLV-2 a une capacité plus importante à évoluer et à s'adapter, ce qui pourrait le rendre plus virulent, plus pathogène ou plus difficile à traiter.

Ce changement de dynamique du virus HTLV-2 pourrait être lié au changement du mode de transmission principal de ce virus entre les deux types de populations.

2. LES MODES DE TRANSMISSION DES VIRUS HTLV

La transmission des virus HTLV entre personnes est relativement inefficace et nécessite des contacts répétés (Gessain, 2011). Ainsi, les modes de transmission principaux du virus HTLV sont : la transmission mère-enfant, principalement via l'allaitement, les rapports sexuels et le passage de cellules sanguines infectées dans le sang suite à des transfusions ou des échanges de seringues entre toxicomanes (**Tableau 1**).

a) La transmission de la mère à l'enfant

La transmission du virus HTLV la plus courante est celle de la mère à l'enfant, même si son efficacité n'a été estimée qu'à environ 20%. Cette transmission se fait essentiellement lors de l'allaitement avec passage de cellules infectées dans le lait (Wiktor et al., 1997). Le risque de transmission est d'autant plus élevé que le temps de l'allaitement est long. D'autres facteurs de risques ont été identifiés : une charge provirale élevée chez la mère (Li et al., 2004) et une correspondance de complexe d'histocompatibilité de type I (CMH I) entre la mère et l'enfant (Biggar et al., 2006) augmentent le risque de transmission.

La transmission de la mère à l'enfant durant la grossesse et l'accouchement est également possible même si elle est très peu efficace (5% des cas) (Bittencourt et al., 2002).

b) Les transmissions sexuelle et sanguine

Le virus HTLV, présent dans les sécrétions génitales, est également transmissible sexuellement. Comme toute infection sexuellement transmissible, les facteurs de risques sont : rapports sexuels non protégés, partenaires sexuels multiples, contacts répétés avec un partenaire sexuel infecté, présence d'ulcères génitaux (Murphy et al., 1996). Une caractéristique de la transmission sexuelle du virus HTLV est qu'elle se fait préférentiellement, mais non exclusivement, de l'homme vers la femme, même si certaines études ne montrent pas cette préférence (pour revue (Proietti et al., 2005)).

La transmission du virus suite à une transfusion sanguine est la plus efficace : environ 40% des receveurs de sang contaminé deviennent séropositifs dans un délai de 51 à 65 jours après la transfusion (Manns et al., 1992). Le risque de transmission est associé à la transfusion de produits sanguins contenant des cellules infectées et notamment les concentrés de globules rouges (Sullivan et al., 1991). La réfrigération du sang réduit le risque

de transmission, probablement à cause de la mort des cellules infectées (Donegan et al., 1990). Aujourd'hui, avec le développement de l'injection de drogues, une autre voie importante de transmission est le partage des seringues par les toxicomanes (Feigal et al., 1991).

VOIES DE TRANSMISSION (efficacité de la transmission)	MOYENS DE PREVENTION
<ul style="list-style-type: none"> - Transmission mère-enfant : <ul style="list-style-type: none"> • par l'allaitement (20%) • in utero • lors de l'accouchement 	<ul style="list-style-type: none"> - Dépistage des femmes enceintes - Arrêt ou limitation de l'allaitement
<ul style="list-style-type: none"> - Transmission sexuelle 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de préservatifs
<ul style="list-style-type: none"> - Transmission suite à une transfusion (40%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dépistage des dons de sang
<ul style="list-style-type: none"> - Transmission par échange de seringues 	<ul style="list-style-type: none"> - Information des utilisateurs de drogues par injection - Utilisation de seringues à usage unique

TABEAU 1: VOIES DE TRANSMISSION DU VIRUS HTLV ET STRATEGIES DE PREVENTION ASSOCIEES

3. MOYENS DE PREVENTION

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement contre l'infection par le virus HTLV. La faible variabilité génétique du virus HTLV laisse espérer la mise au point d'un vaccin qui permettrait une prophylaxie efficace. Malheureusement, le marché pour un tel vaccin étant limité économiquement, peu d'essais ont à ce jour été réalisés. Le meilleur moyen de lutter contre ce virus est donc de mettre en place des stratégies pour prévenir les infections (**Tableau 1**). Ceci est permis grâce à notre bonne compréhension des modes de transmission. Des méthodes de prévention efficaces ont ainsi été mises en place pour contrer toutes les routes de la transmission (pour revue (Gessain, 2011)).

a) Prévention de la transmission mère-enfant

La principale mesure pour prévenir la transmission de la mère à l'enfant est le dépistage des femmes enceintes pour permettre les recommandations adéquates, essentiellement éviter l'allaitement. Arrêter ou réduire le temps d'allaitement est une mesure très efficace dans les pays développés et notamment au Japon. Dans ce pays, un

programme de prévention mis en place en 1987 a permis de réduire le risque de transmission de la mère à l'enfant de 20% à 2,5% en nourrissant les nouveau-nés uniquement au biberon (Hino, 2011). Cependant, elle est beaucoup plus difficile à mettre en place dans les pays en développement et notamment en Afrique où la malnutrition des enfants est déjà un problème majeur. Les priver du lait maternel est donc très compliqué. Malheureusement, même si la fréquence est rare, il n'est aujourd'hui pas possible de prévenir la transmission du virus de la mère à l'enfant *in utero* ou lors de l'accouchement.

b) Prévention de la transmission sexuelle et sanguine

Comme pour toutes les infections sexuellement transmissibles, l'utilisation du préservatif protège de façon très efficace la transmission lors des rapports sexuels.

Le risque de contamination par le virus HTLV à la suite d'une transfusion est aujourd'hui quasi nul dans tous les pays qui ont mis en place un dépistage obligatoire des dons de sang. En France, cette mesure a d'abord été mise en place, dès 1989 dans les départements d'Outre-mer, puis en métropole à partir de 1991. Le risque est ainsi devenu quasi inexistant : il a été estimé à 1 cas sur 345 000 transfusions entre 1996 et 1998 (Courouce et al., 1998). Là encore, cette mesure est malheureusement beaucoup plus difficile à mettre en place dans les pays en développement, où le virus est pourtant souvent endémique.

Enfin, pour éviter la contamination suite aux échanges de seringue entre les utilisateurs de drogues par injection, il faut les informer correctement des risques de cette pratique.

II. LE VIRUS HTLV-1 : UN RETROVIRUS LYMPHOTROPE QUI JOUE A CACHE-CACHE AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Les virus HTLV sont des rétrovirus et en possèdent les caractéristiques morphologiques et génomiques. Dans cette partie, nous allons essentiellement présenter le virus HTLV-1 et nous évoquerons le virus HTLV-2 lorsque celui présentera des différences significatives avec le virus HTLV-1.

A. LA PARTICULE VIRALE

Peu de détails sont disponibles sur l'organisation de la particule du virus HTLV-1 (pour revue (Fogarty et al., 2011b)). La description de la particule virale se base donc souvent sur une comparaison avec les autres rétrovirus et notamment le VIH.

1. COMPOSITION DE LA PARTICULE VIRALE

Dès la découverte du virus en 1980, les premières observations en microscopie électronique ont permis de caractériser la morphologie générale des particules virales (Ohtsuki et al., 1982). Ainsi, le virus HTLV-1 a rapidement été qualifié de virus de type C : une forme ronde ou légèrement irrégulière avec un cœur central de densité variable entouré d'une enveloppe mais sans spicules observées à la surface. Les premières estimations de taille de ces particules virales ont montré une variation assez importante, allant de 85 à 145nm (**Figure 11A**).

De façon plus détaillée, le virion est enveloppé par une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines d'origine virale, formées de deux sous-unités, l'une transmembranaire (TM ou gp21) et l'autre de surface (SU ou gp46). Associée au feuillet interne de l'enveloppe, une couche de protéines de matrice (p19) permet de faire le lien entre l'enveloppe et la capsid virale (p24) et d'organiser l'ensemble de la particule virale sous la membrane plasmique au moment de l'assemblage (**Figure 11C**). Une étude a mis en évidence l'homodimérisation covalente des protéines de matrice par un pont disulfure (Rayne et al., 2004). Un modèle a ainsi été proposé avec une organisation hexamérique des protéines de matrice permettant une interaction entre les protéines de matrice et un trimère de glycoprotéines d'enveloppe TM au centre des hexamères (**Figure**

11B) (Rayne et al., 2004). La capside virale icosahédrique protège les deux copies du génome viral ARN, associées aux enzymes virales (protéase, intégrase et transcriptase inverse) et à la nucléocapside pour former deux complexes ribonucléoprotéiques (Verdonck et al., 2007) (**Figure 11C**). Ces ribonucléoparticules contiennent également un ARN de transfert d'origine cellulaire, spécifique de la proline, nécessaire lors de l'infection d'une nouvelle cellule pour l'initiation de la transcription inverse (Comité international de taxonomie des virus, 2011). A noter aussi que les deux génomes viraux sont maintenus associés grâce à des liaisons hydrogènes.

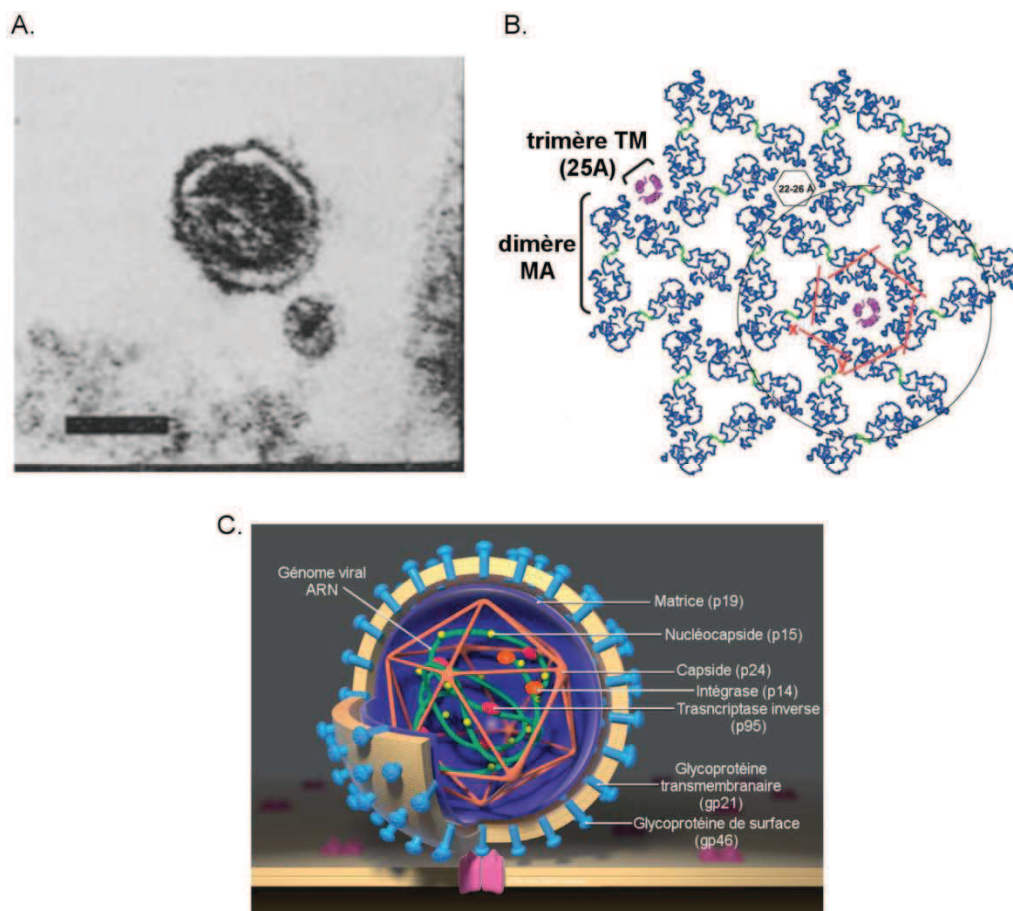


FIGURE 11 : STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE HTLV-1

A. Caractérisation d'une particule mature du rétrovirus HTLV-1 en microscopie électronique. Le rétrovirus HTLV-1 a une morphologie caractéristique des virus de type C. La barre représente 0,2μm. D'après (Ohtsuki et al., 1982).

B. Modèle d'organisation des dimères de protéines de matrice en un réseau hexamérique. Les protéines de matrice forment des homodimères liés covalamment par un pont disulfure. L'organisation des dimères ensuite pour former des hexamères sous l'enveloppe virale permet d'interagir avec les queues des trimères de glycoprotéines d'enveloppe enchâssés dans l'enveloppe virale (environ 25 Angström de diamètre) au niveau du centre de ces hexamères (22 à 26 Angström de diamètre calculés). Le cercle représente la surface occupée par les glycoprotéines d'enveloppe à l'extérieur de l'enveloppe virale. D'après (Rayne et al., 2004).

C. Modèle de la particule virale mature du virus HTLV-1. Adapté de (Lairmore et al., 2012).

Une étude récente utilisant des techniques de pointe (spectroscopie des fluctuations de fluorescence et microscopie cryo-électronique) a permis d'affiner la structure de cette particule au niveau moléculaire. La taille des particules virales mesurée par ces deux techniques est de l'ordre de 75nm en moyenne, donc plus petite que celle estimée précédemment, même si cette taille peut varier de 30 à 237nm. De plus, cette étude a montré que les particules virales immatures ne contenaient qu'environ 500 copies de la protéine Gag, précurseur des protéines de matrice, capsid et nucléocapsid, alors qu'il y en a environ 1300 dans une particule du VIH. Ceci suggère une organisation totalement différente entre les particules virales des deux virus, contrairement à ce qui était communément admis (Grigsby et al., 2010).

Au niveau biochimique, la composition de la particule virale peut être disséquée. Les protéines en sont les constituants principaux, représentant 60% de la masse sèche du virion. Les lipides et les sucres, présents essentiellement sur les glycoprotéines d'enveloppe, représentent 35% et 3% de la masse sèche, respectivement. Enfin les acides nucléiques, à savoir les deux génomes viraux ARN et l'ARN de transfert, ne représentent seulement que 2% de la masse sèche du virion (Comité international de taxonomie des virus, 2011).

2. LE GENOME VIRAL

Le génome du virus HTLV-1 est caractéristique d'un rétrovirus. Il est constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin de 8,5 kilobases chacune. Ces molécules d'ARN sont polyadénylées en 3' et coiffées en 5' (Comité international de taxonomie des virus, 2011). A chaque extrémité se trouve une région de séquences répétées (R) ainsi qu'une région unique (U5 à l'extrémité 5' et U3 à l'extrémité 3') (**Figure 12A**). Les protéines structurales classiques des rétrovirus, Gag et Env, sont codées par ce génome, ainsi que les enzymes virales nécessaires à la multiplication du virus, protéase (gène *Pro*) et intégrase et transcriptase inverse (gène *Pol*). Le génome du virus HTLV-1 présente une région supplémentaire en 3', dont la fonction était inconnue lors de sa découverte et a donc été nommée pX (**Figure 12A**) (pour revue (Kannian and Green, 2010; Lairmore and Franchini, 2007)).

Après la transcription inverse, dans sa forme ADN provirale intégrée, le génome possède deux séquences identiques aux deux extrémités, les LTR (U3-R-U5) (**Figure 12B**). Ces séquences sont les promoteurs viraux, nécessaires à la transcription à partir de l'extrémité 5'

et 3' du génome, et contiennent également les signaux de polyadénylation de fin de transcription. Plusieurs espèces d'ARN messagers (ARNm), tous coiffés en 5' et polyadénylés en 3', sont transcrits à partir de ces promoteurs pour donner naissance à toutes les protéines virales. L'ARN de longueur génomique peut bien sûr être encapsidé pour devenir un nouveau génome viral dans les nouveaux virions formés. Un signal d'encapsidation a en effet été identifié, en 2 parties, dans le génome du virus BLV et les mêmes régions dans le génome des virus HTLV-1 et HTLV-2 semblent avoir conservé cette fonction de signal d'encapsidation (Mansky and Gajary, 2002). Ces deux régions, formant des structures tige-boucles, sont localisées dans le gène Gag, juste en aval du codon initiateur pour l'une et dans le domaine capsidique pour l'autre (**Figure 12A**).

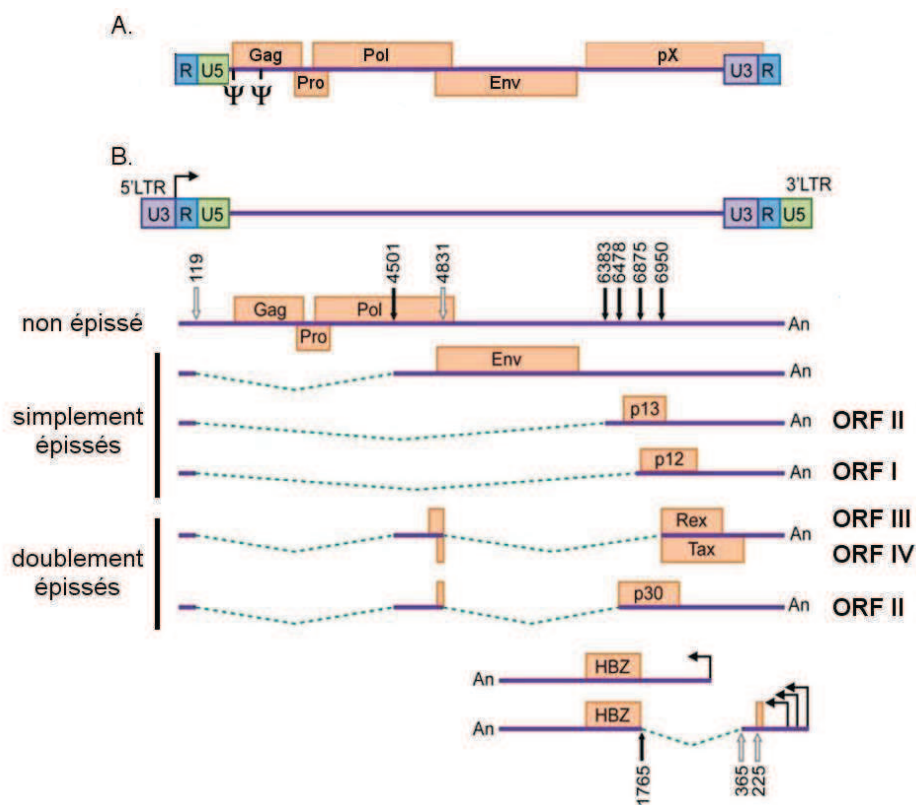


FIGURE 12 : ORGANISATION DU GÉNOME DU VIRUS HTLV-1

A. Organisation des cadres ouverts de lecture au sein du génome viral ARN simple brin. A chaque extrémité du génome des séquences répétées (R) et une séquence unique U5 et U3. En plus des gènes caractéristiques des rétrovirus *gag*, *pro*, *pol* et *env*, une région pX contenant 4 cadres ouverts de lecture en 3' du génome code des protéines régulatrices et accessoires. Les deux régions du signal d'encapsidation (Ψ) identifiées dans le génome du virus BLV sont indiquées.

B. Organisation du génome proviral et des transcrits du virus HTLV-1. Comparé au génome viral ARN, le génome proviral possède deux LTR identiques à ses deux extrémités. Les ARNm transcrits à partir des LTR 5' (majoritaire) et 3' (minoritaire) sont indiqués. Ils sont de 3 types : non épissés, simplement épissés ou doublement épissés avec les introns indiqués en pointillés. Les sites donneurs d'épissage (flèches vides) et accepteurs d'épissage (flèches pleines) sont indiqués ainsi que leur position dans le génome viral. Le cadre ouvert de lecture (ORF) dans lequel sont traduites les protéines est indiquée à droite. Adapté de (Kannian and Green, 2010).

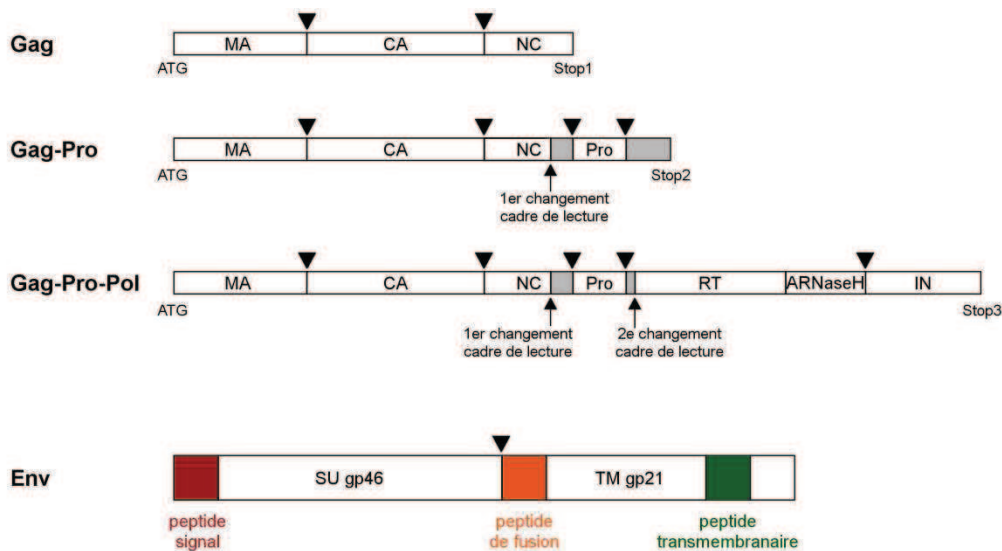


FIGURE 13 : ORGANISATION ET CLIVAGE DES PRECURSEURS DES PROTEINES STRUCTURALES ET ENZYMATIQUES DU VIRUS HTLV-1

Les 3 précurseurs protéiques traduits à partir de l'ARNm de longueur génomique Gag, Gag-Pro (après un changement de cadre de lecture) et Gag-Pro-Pol (après deux changements de cadre de lecture) sont clivés par la protéase virale pour donner de nombreuses protéines : matrice (MA), capside (CA), nucléocapside (NC), protéase (Pro), transcriptase inverse (RT) + ARNase H, intégrase (IN). Le précurseur de l'enveloppe (gp 62) est également clivé en deux sous-unités SU et TM par une protéase cellulaire. Les sites de clivages sont indiqués par des têtes de flèche. Adapté de (Lairmore and Franchini, 2007).

L'ARN de longueur génomique peut également être traduit en plusieurs protéines. En effet, la traduction du premier cadre ouvert de lecture permet de produire la protéine Gag de 55 kilodaltons (kDa) (p55), alors qu'un décalage du cadre de lecture par le ribosome au niveau du premier codon stop déclenche la traduction de la protéine de fusion Gag-Pro. Un nouveau décalage du cadre de lecture au niveau du deuxième codon stop permet finalement de traduire la protéine Pol en fusion avec Gag-Pro (**Figure 13**). Le précurseur Gag est ensuite clivé par la protéase virale en 3 polypeptides : la protéine de matrice (MA ou p19), de capside (CA ou p24) et de nucléocapside (NC ou p15). Le clivage du précurseur Gag-Pro donnera en plus de ces trois protéines structurales, la protéase virale. Enfin, le précurseur Gag-Pro-Pol est également clivé et donne en plus de toutes les protéines citées précédemment deux enzymes virales : la transcriptase inverse (p95) et l'intégrase (p14). Ainsi, un même ARNm donne naissance à six protéines qui formeront la particule virale (**Figure 13**). Le virus HTLV-1, comme beaucoup d'autres virus, met en place des stratégies diverses qui lui permettent d'augmenter sa capacité codante malgré un génome de taille limitée. Toujours à partir du même promoteur viral, un ARNm simplement épissé va permettre la traduction de la protéine Env (gp62) (**Figure 12B**). De la même façon que les autres protéines structurales, le précurseur Env est clivé mais par une protéase cellulaire,

pour donner les deux sous-unités TM (gp21) transmembranaire et SU (gp46) en surface (**Figure 13**) (pour revue (Lairmore and Franchini, 2007)).

La région pX, dont on connaît maintenant les fonctions codantes est en fait composée de 4 cadres ouverts de lecture (ORF I, ORF II, ORF III et ORF IV) codant les protéines régulatrices et auxiliaires du virus (Kannian and Green, 2010). Alors que les protéines régulatrices Tax et Rex sont essentielles à la multiplication virale *in vitro* et *in vivo*, les protéines auxiliaires, p12, p8, P13 et p30 ne sont pas indispensables pour la multiplication du virus *in vitro* mais sont importantes pour l'infectivité et la persistance du virus *in vivo* (pour revue (Edwards et al., 2011)). L'ORF I va être traduite à partir d'un ARNm simplement épissé pour donner la protéine p12 (**Figure 12B**). Là encore un clivage est possible avec la production de la protéine p8. A partir de l'ORF II, deux protéines vont être traduites à partir de deux ARNm différents : un ARNm simplement épissé donnera la protéine p13 alors qu'un ARNm doublement épissé donnera une protéine de 30kDa (p30) (**Figure 12B**). Enfin, les protéines régulatrices, Rex et Tax, sont toutes les deux traduites à partir d'un même ARNm simplement épissé, l'une dans l'ORF III et l'autre dans l'ORF IV, respectivement (**Figure 12B**). Il est à noter qu'une protéine p21 a été identifiée dans les cellules infectées par le virus HTLV-1 et est produite à partir de l'ORF III sur un ARNm doublement épissé mais la fonction de cette protéine reste aujourd'hui inconnue (Lairmore and Franchini, 2007). L'épissage alternatif est donc une stratégie supplémentaire utilisée par le virus HTLV-1 pour augmenter sa capacité codante.

La transcription anti-sens à partir du brin de polarité négative du génome proviral a été mise en évidence dès 1989 alors que la traduction de ces transcrits anti-sens n'a été prouvée que 13 ans plus tard (Gaudray et al., 2002; Larocca et al., 1989). Les protéines HBZ (*HTLV-1 Basic leucine Zipper Factor*) sont ainsi traduites à partir de 3 ARNm transcrits (non épissés ou épissés de façon alternative). Les ARNm épissés sont transcrits à partir des régions R et U5 du LTR à l'extrémité 3' du génome, alors que la forme non épissée a son promoteur dans l'intron des formes épissées (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006; Satou et al., 2006) (**Figure 12B**). La protéine HBZ la plus abondante dans la cellule infectée est l'isoforme de 206 acides aminés, traduite à partir du variant le plus épissé. Depuis des protéines antisens ont été identifiés chez tous les virus HTLV (pour revue (Barbeau and Mesnard, 2011)). Il est à noter que des transcrits anti-sens sont également codés par le génome du virus HIV1 (Michael et al., 1994)

L'organisation génomique du virus HTLV-2 est similaire à celle du virus HTLV-1 (pour revue (Feuer and Green, 2005)). Les protéines structurales et enzymatiques sont identiques. Seules quelques variations au niveau de la taille des protéines régulatrices et auxiliaires produites sont observées. Les seules différences sont : un cadre ouvert de lecture supplémentaire dans la région pX (ORF V) codant une protéine p11 dont la fonction n'est pas clairement identifiée et l'absence de protéine équivalente à p13 dans l'ORF II du génome d'HTLV-2 (**Tableau 2**).

	HTLV-1	HTLV-2
ORF I	▪ p12	▪ p10
ORF II	▪ p30 ▪ p13	▪ p28
ORF III	▪ Rex (p27) ▪ p21	▪ Rex (p26/p24) ▪ p22/p20
ORF IV	▪ Tax (p40)	▪ Tax (p37)
ORF V		▪ p11
Antisens	▪ HBZ	▪ APH2

TABLEAU 2 : COMPARAISON DES PROTEINES REGULATRICES ET AUXILIAIRES DES VIRUS HTLV-1 ET HTLV-2

B. LE CYCLE DE MULTIPLICATION : UN CLASSIQUE POUR UN RETROVIRUS

Comme pour la structure de la particule virale, le cycle de multiplication du virus HTLV-1 est classique pour un rétrovirus. L'interaction des glycoprotéines d'enveloppe, à la surface de la particule virale, avec des récepteurs spécifiques, à la surface des cellules hôtes, permet au virus d'adhérer puis d'entrer dans la cellule hôte par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Une fois entré dans la cellule, le virus transforme son génome ARN simple brin en ADN double brin lors de la transcription inverse puis, après décapsidation, ce génome entre dans le noyau toujours associé aux protéines de nucléocapside et à l'intégrase, à l'occasion de la dissolution de l'enveloppe nucléaire lors de la division cellulaire. L'intégrase va ainsi pouvoir insérer le génome viral dans le génome cellulaire. L'expression de nouvelles protéines virales ainsi que la production de nouveaux génomes viraux à partir de ce provirus intégré va ensuite permettre l'assemblage puis la sortie de nouvelles particules virales au niveau de la membrane plasmique (**Figure 14**).

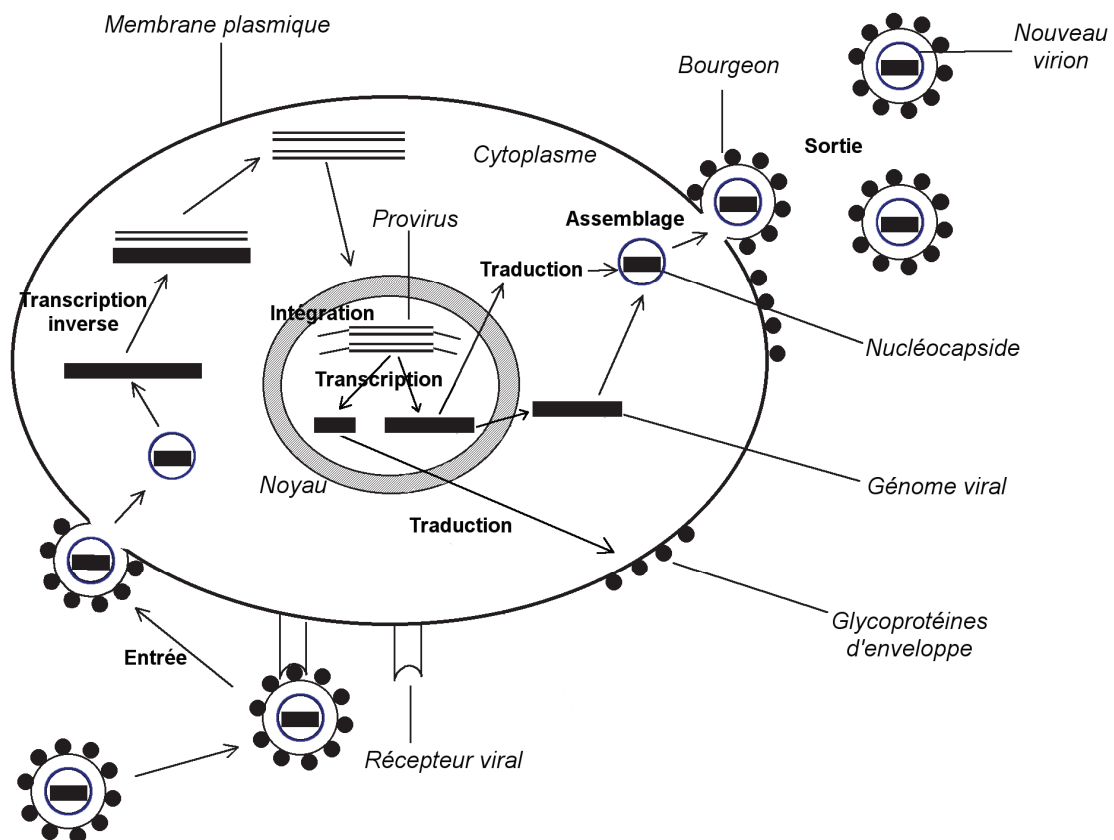


FIGURE 14 : CYCLE DE MULTIPLICATION VIRALE D'UN RETROVIRUS

Le cycle de multiplication du virus HTLV-1 est classique pour un rétrovirus avec des étapes précoces (entrée, transcription inverse et intégration du génome viral dans le génome cellulaire) puis des étapes tardives (expression du provirus, assemblage et sortie). Adapté de (Florins et al., 2007).

1. LE DETOURNEMENT DE 3 RECEPTEURS POUR L'ENTREE DU VIRUS

Les virus étant des parasites intracellulaires obligatoires, ils ne peuvent se multiplier qu'avec l'aide des machineries cellulaires. La première étape de leur multiplication consiste donc à entrer dans une nouvelle cellule-hôte afin de pouvoir s'y multiplier en utilisant dès que possible la machinerie cellulaire. Pour cela, le virus doit passer une première barrière physique : la membrane plasmique. Avant de pouvoir entrer, le virus doit s'attacher, via ses glycoprotéines d'enveloppe, à la surface de la cellule-hôte qui présente des récepteurs spécifiques.

Dans le cas du virus HTLV-1, la structure de la glycoprotéine d'enveloppe n'a été que partiellement élucidée. Cette glycoprotéine est composée de deux sous-unités. La sous-unité SU ou gp46 est maintenue associée à la particule virale grâce à des liaisons non covalentes et

un pont disulfure formés avec la sous-unité transmembranaire TM ou gp21. L'organisation structurale de la sous-unité SU a surtout été prédite à partir d'homologies de séquence avec la protéine SU des Gammaretrovirus et notamment du virus de la leucémie murine (MLV). Ainsi la protéine SU est composée de 3 domaines : un domaine N-terminal qui permet l'interaction avec les récepteurs cellulaires (RBD pour *Receptor Binding Domain*) et un domaine C-terminal (CTD pour *C-Terminal Domain*) qui permet l'interaction avec d'autres récepteur et contient la cystéine impliquée dans le pont disulfure avec la sous-unité TM. Ces deux domaines RBD et CTD sont séparés par un domaine riche en proline (PRR pour *Proline-Rich Region*) qui permet une flexibilité de la structure protéique et donc des changements de conformation (**Figure 15A**) (Kim et al., 2004). C'est donc la sous-unité SU qui permet l'interaction de la particule virale avec les récepteurs cellulaires. Plusieurs récepteurs ont été identifiés à la surface des cellules. Les premiers d'entre eux sont les protéoglycanes à héparanes sulfates ou HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycans*). En effet, l'élimination des HSPG de la surface cellulaire empêche la liaison de la protéine SU soluble et l'infection des cellules par des particules pseudotypées avec l'enveloppe de HTLV-1 (Pinon et al., 2003). Le transporteur de glucose GLUT1 a également été impliqué dans l'entrée des virus HTLV-1 grâce à sa capacité à lier la sous-unité SU. L'importance de deux acides aminés de la sous-unité SU (D106 et Y114) a notamment été mise en évidence dans l'interaction avec GLUT1 (Manel et al., 2003a). Enfin, un troisième récepteur a été identifié plus récemment : la neuropiline 1 (NRP-1). Comme pour les deux autres récepteurs, cette protéine membranaire interagit avec la SU et favorise l'entrée efficace de HTLV-1 (Ghez et al., 2006). Un motif, comparable au motif d'interaction présent chez un ligand naturel de NRP-1, VEGF-165 (*Vascular Endothelial Growth Factor*) a été mis en évidence dans la séquence de la SU entre les acides aminés 90 et 94 (KKPNR) et impliqué dans l'interaction avec NRP-1 (Lambert et al., 2009). Le modèle actuel fait état d'une coopération de ces trois récepteurs pour permettre l'attachement du virus HTLV-1 à la surface des cellules et son entrée ultérieure (**Figure 15B**) (Jones et al., 2011). En mimant le VEGF-165, le virus HTLV-1 va d'abord s'attacher à la surface de la cellule grâce à une interaction entre la SU et les HSPG, ce qui va lui permettre ensuite d'interagir avec NRP-1. Ces interactions stables vont induire des changements de conformations permettant ensuite l'interaction de la SU avec GLUT-1.

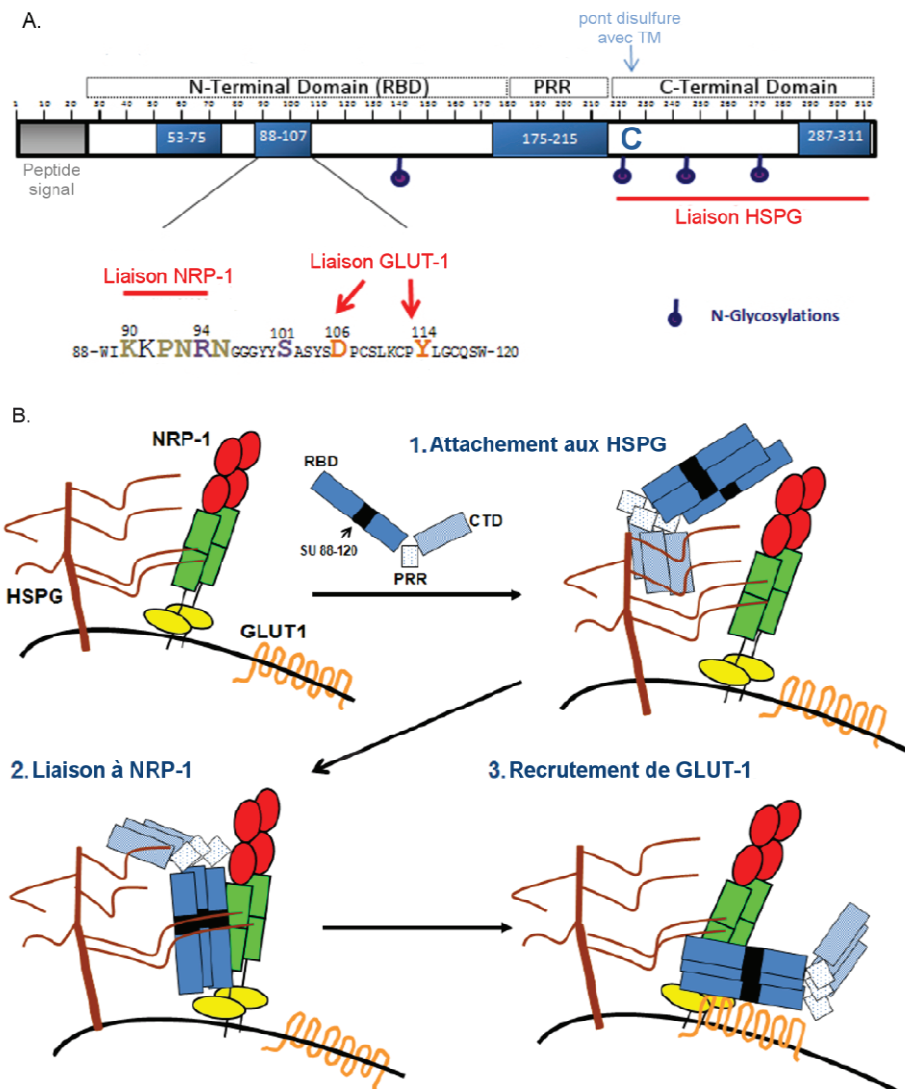


FIGURE 15 : ATTACHEMENT DE HTLV-1 A UNE CELLULE-HOTE GRACE A L'INTERACTION DE LA SOUS-UNITE SU DE LA GLYCOPROTEINE D'ENVELOPPE AVEC 3 RECEPTEURS CELLULAIRES DIFFERENTS

A. Organisation protéique de la sous-unité SU (gp46) de la glycoprotéine d'enveloppe du virus HTLV-1. La SU est composée de 3 domaines : un domaine de liaison aux récepteurs N-terminal ou RBD, un domaine riche en prolines (PRR) et un domaine C-terminal. Les résidus importants pour l'interaction avec les différents récepteurs sont mis en évidence ainsi que la cystéine impliquée dans le pont disulfure avec la sous-unité TM et les N-glycosylations sont indiqués.

B. Modèle de coopération de 3 récepteurs pour l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire. La sous-unité SU interagit d'abord avec les chaînes d'héparane sulfate des HSPG via son domaine CTD permettant un premier attachement de la particule virale à la surface de la cellule. Les HSPG interagissant également avec NRP-1, ce récepteur est ensuite recruté et le motif 90-94 du domaine RBD de la sous-unité SU interagit avec NRP-1 en imitant le mécanisme moléculaire utilisé par le ligand naturel de NRP-1, VEGF-165. Suite à ces interactions, un changement de conformation de la sous-unité SU va permettre l'interaction de cette protéine avec le récepteur GLUT1.

Adapté de (Jones et al., 2011).

Ces changements de conformation vont se répercuter sur la sous-unité TM qui va insérer son peptide de fusion, présent à l'extrémité N-terminale de la sous-unité, dans la membrane plasmique. Ce peptide de fusion, très hydrophobe, est masqué au sein de la glycoprotéine d'enveloppe afin de ne pas s'insérer dans n'importe quelle membrane avant

l'attachement du virus sur ses récepteurs spécifiques. Les protéines TM, qui sont en fait associées en trimères, vont ensuite se replier sur elles-mêmes pour former des structures en épingle à cheveux et ainsi rapprocher l'enveloppe virale et la membrane plasmique. Les deux bicouches, très proches, vont d'abord fusionner leurs feuillets externes pour former ce qu'on appelle une tige (stalk), ce qui va ensuite permettre un rapprochement des parties hydrophobes des feuillets internes (hémifusion) et enfin la fusion de ces feuillets internes pour ouvrir un pore de fusion (**Figure 16**). Ce modèle de fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire a surtout été établi suite à l'étude d'autres glycoprotéines d'enveloppe virales mais l'organisation en trimère d'épingles à cheveux ou faisceau de 6 hélices a été confirmée pour la sous-unité TM du virus HTLV-1 par cristallographie, corroborant ainsi ce modèle (Kobe et al., 1999; Maerz et al., 2000).

Alors que le virus HTLV-2 interagit aussi avec NRP-1 et GLUT-1, il n'utilise pas les HSPG pour entrer dans les cellules (Ghez et al., 2006; Jones et al., 2006).

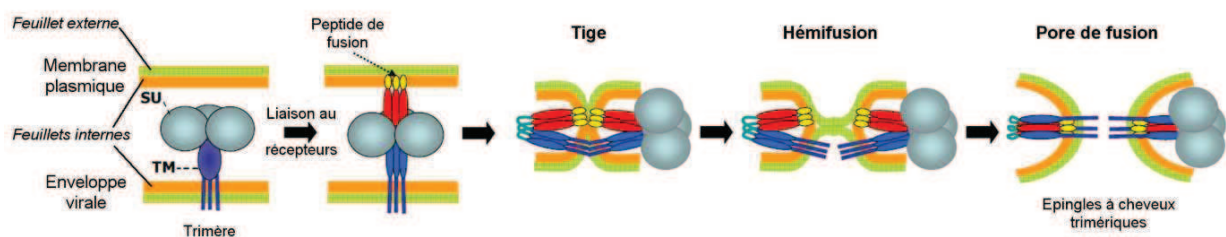


FIGURE 16 : MODELE DE FUSION DE L'ENVELOPPE VIRALE ET DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Suite à l'interaction des sous-unités SU du trimère de glycoprotéines d'enveloppe avec les récepteurs cellulaires, des changements de conformation vont permettre l'insertion du peptide de fusion des sous-unités TM dans la membrane plasmique. Ainsi, les protéines TM sont à la fois ancrées dans l'enveloppe virale par leur domaine transmembranaire et dans la membrane plasmique par ce peptide de fusion. En se repliant, les protéines TM vont ainsi rapprocher les deux bicouches lipidiques et aboutir à la formation d'un pore en passant par les stades de tige et d'hémifusion. Adapté de (Melikyan, 2008).

2. DU VIRUS AU PROVIRUS : LA TRANSCRIPTION INVERSE ET L'INTEGRATION, ETAPES CLES DU CYCLE DES RETROVIRUS

Une fois le pore formé, la capside entre dans le cytoplasme de la cellule-hôte et le virus va poursuivre son cycle de multiplication. Grâce à l'énergie et aux nucléotides disponibles dans la cellule, le virus va réaliser la transcription inverse, c'est-à-dire transformer son génome ARN simple brin en ADN double brin. Cette étape est commune à

tous les rétrovirus et est possible grâce à une enzyme spécifique de ces virus, la transcriptase inverse. La synthèse d'un brin d'ADN de polarité négative est initiée grâce à l'extrémité 3'-OH d'un ARN de transfert (Proline pour HTLV-1) hybridé sur la séquence PBS (*Primer Binding Site*) (**Figure 17A**). Ainsi, la transcriptase inverse va synthétiser la séquence complémentaire des régions U5 et R de l'extrémité 5' du génome viral. En parallèle, l'activité ARNase H de la transcriptase inverse dégrade le génome viral déjà copié. Le brin d'ADN néo-synthétisé est ensuite transféré à l'autre extrémité du génome, ou sur l'autre copie du génome ARN présent dans la capside virale, grâce à l'hybridation des deux régions R identiques. La synthèse du brin d'ADN de polarité négative peut donc reprendre en parallèle de la dégradation de la matrice ARN. Cependant, une petite séquence riche en purines, PPT (*Poly-Purine Tract*) est résistante à la dégradation par l'ARNase H et offre ainsi une amorce pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive. D'autres régions résistantes à la dégradation par l'ARN offrent parfois des amorces supplémentaires. Le brin de polarité positive peut donc être synthétisé jusqu'à l'extrémité 5' du brin de polarité négative où se situe l'ARNt^{Pro}. La dégradation de cet ARNt par l'activité ARNase H permet ensuite la circularisation partielle du génome par hybridation des séquences PBS à chaque extrémité des brins d'ADN en cours de synthèse. Cette circularisation va permettre à la transcriptase inverse de compléter les deux brins d'ADN pour avoir finalement une double hélice d'ADN avec à chaque extrémité un LTR qui est en fait l'enchaînement des séquences U3/R/U5 (**Figure 17A**) (Coffin et al., 1997).

Durant la mitose et la désorganisation de l'enveloppe nucléaire, le virus va pouvoir atteindre le noyau et le génome cellulaire. Ainsi, après une décapsidation préalable, le génome viral ADN va être intégré dans le génome cellulaire grâce à une autre enzyme spécifique des rétrovirus : l'intégrase. L'intégrase clive deux nucléotides aux extrémités 3' des deux brins d'ADN ce qui va générer des extrémités 3'-OH. Grâce à l'action catalytique de l'intégrase, ces extrémités vont ensuite attaquer les liaisons phosphodiester sur les deux brins d'ADN cellulaire à quelques nucléotides d'intervalle, permettant la création de liaisons phosphodiester entre l'extrémité 3' de chaque brin d'ADN viral avec un brin d'ADN cellulaire. La complétion des quelques nucléotides manquants en 5' de chaque brin viral et la ligation par les enzymes cellulaires terminent ce processus d'intégration du génome viral dans le génome cellulaire (**Figure 17B**) (Coffin et al., 1997).

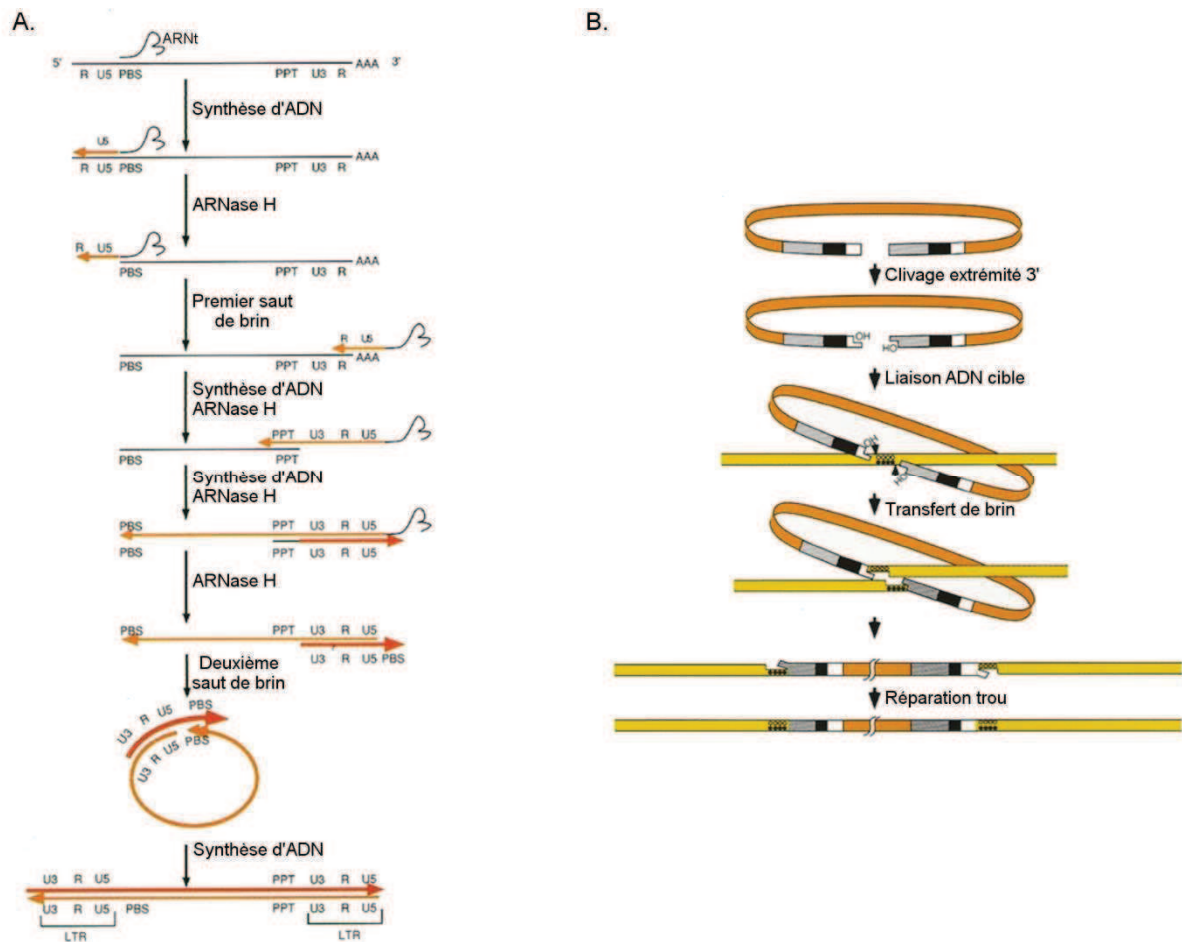


FIGURE 17 : MECANISMES MOLECULAIRES DE LA TRANSCRIPTION INVERSE ET DE L'INTEGRATION

A. La transcription inverse pour transformer le génome ARN simple brin en ADN double brin est réalisée en plusieurs étapes grâce aux différentes activités de la transcriptase inverse (ADN polymérase ARN dépendante, ADN polymérase ADN dépendante et ARNase H). L'ARN viral est représenté en noir alors que les brins d'ADN négatif et positif sont représentés en orange clair et foncé, respectivement.

B. L'intégration du génome viral (orange) dans le génome cellulaire (jaune) est réalisée grâce à l'intégrase virale. Les LTR sont représentés à chaque extrémité du génome viral par des régions grises, noires et blanches. Une fois intégré, le virus s'appelle un provirus. Adapté de (Coffin et al., 1997).

3. LA SYNTHÈSE DES NOUVEAUX COMPOSANTS VIRAUX, UNE ÉTAPE FINEMENT RÉGULÉE DANS LE TEMPS ET DANS L'ESPACE

Une fois le génome viral intégré dans le génome cellulaire, le virus, alors appelé provirus, utilise la machinerie cellulaire pour synthétiser les composants de nouveaux virions, aussi bien les protéines structurales et enzymatiques que les génomes viraux. Notamment, la machinerie cellulaire de transcription va être détournée pour produire tous les ARNm décrits précédemment (cf II-A-2). L'essentiel des ARNm sont transcrits à partir du LTR 5' et seuls les ARNm *hbx* sont transcrits à partir du LTR 3'. Plusieurs facteurs cellulaires sont capables d'activer une transcription basale à partir du LTR viral : Sp1, Elk1, SRF et XBP-1 notamment (Ku et al., 2008; Livengood and Nyborg, 2004; Winter et al., 2007). La protéine

régulatrice virale Tax peut ainsi être exprimée dans les cellules et va ensuite permettre une forte activation de la transcription à partir des promoteurs viraux (Seiki et al., 1986) (**Figure 18**). En effet, la région U3 du LTR contient 3 séquences de 21 paires de bases qui sont des éléments de réponse à Tax ou TRE-1 (*Tax Response Element*). En fait ces éléments de réponse TRE sont composés d'un motif octamérique [TGACG(T/A)(C/G)(T/A)] flanqué en 5' d'une séquence riche en G et en 3' d'une séquence riche en C (Brady et al., 1987). Or ce motif est très similaire à l'élément de réponse à l'AMPcycloique ou CRE (*cAMP Response Element*) de séquence [TGACGTCA] (Jeang et al., 1988). Ainsi, la protéine Tax qui n'a pas la capacité de se lier directement à l'ADN peut détourner les facteurs de transcription cellulaires de la famille CREB/ATF (*CRE binding protein/Activating Transcription Factor*) pour qu'ils se fixent sur le promoteur viral (Zhao and Giam, 1992) (**Figure 18**). En fait, la formation de dimères de Tax est nécessaire au recrutement des protéines CREB/ATF et à l'activation optimale du promoteur viral (Jin and Jeang, 1997; Tie et al., 1996). Au niveau moléculaire, Tax interagit avec le domaine *basic-region leucine zipper* (bZIP), caractéristique de cette famille de facteurs de transcription, favorisant ainsi leur dimérisation et permettant leur liaison sur les éléments de réponse TRE (Wagner and Green, 1993). La formation de ce complexe ternaire sur le promoteur viral au niveau des éléments de réponse TRE est de plus stabilisée par le contact de Tax avec le petit sillon de l'ADN au niveau des régions riches en G et C de chaque côté de l'octamère (Kimzey and Dynan, 1998; Lundblad et al., 1998). Tax est en plus capable d'interagir directement avec les co-facteurs *CREB Binding Protein* (CBP) et p300 qui peuvent être recrutés au niveau du promoteur viral même en absence de phosphorylation de CREB, ce qui permet une activation spécifique du promoteur viral en absence de signalisation AMPc et donc en l'absence de la phosphorylation de CREB (Kwok et al., 1996) (**Figure 18**). Une étude récente a cependant montré que la phosphorylation de CREB sur la sérine 133 était nécessaire à la formation d'un complexe quaternaire (ADN/CREB/Tax/CBP/p300) stable sur le LTR (Kim et al., 2007). A ce complexe multiprotéique s'ajoute également PCAF (*p300/CBP Associated Factor*) (Harrod et al., 2000; Jiang et al., 1999) (**Figure 18**). La formation de l'ensemble de ce complexe sur les éléments de réponse TRE va permettre l'acétylation des histones et donc la décondensation de la chromatine au niveau du promoteur et des régions 5' proximales favorisant le recrutement de la machinerie de transcription cellulaire et notamment le facteur de transcription TF(II)D et l'ARN polymérase II sur le promoteur viral (Lu et al., 2002) (**Figure 18**). Tax interagit directement

avec TAF(II)28 et TBP (*TATA-Binding Protein*), deux sous-unités du complexe TF(II)D, et avec le complexe TF(II)A et recrute ainsi les facteurs de transcription généraux sur le promoteur et notamment sur la séquence cis-régulatrice TATA du promoteur, favorisant d'autant plus l'activation de la transcription à partir du LTR proviral (Caron et al., 1997; Caron et al., 1993; Clemens et al., 1996). D'autres co-activateurs recrutés par Tax et qui permettent une transactivation optimale du promoteur viral ont été identifiés plus récemment : les protéines TORC-1, -2 et -3 (*Transducer of Regulated CREB activity*) (Koga et al., 2004; Siu et al., 2006).

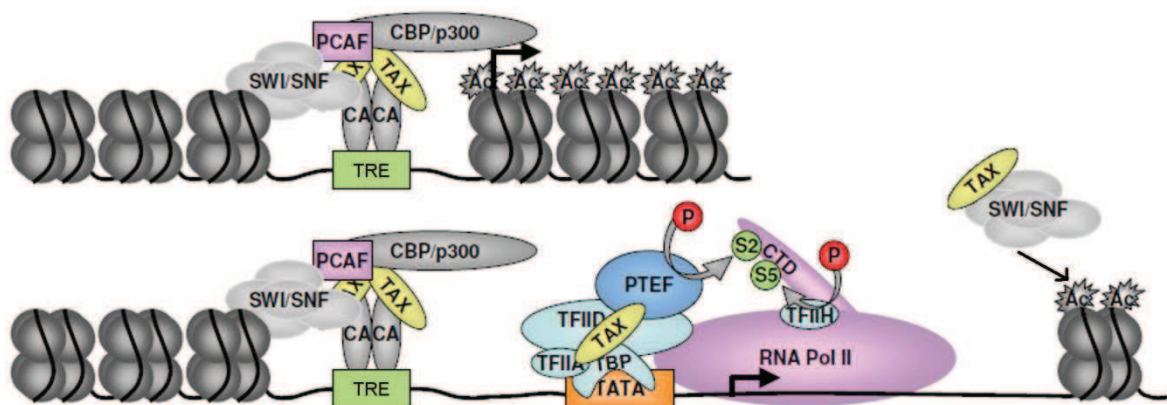


FIGURE 18 : ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION A PARTIR DU PROMOTEUR VIRAL PAR TAX.

La protéine Tax, en interagissant directement avec le domaine bZIP des facteurs de transcription de la famille CREB/ATF (CA), favorise leur dimérisation et leur liaison à l'ADN au niveau des éléments de réponse à Tax (TRE) présents dans le promoteur viral. Tax permet également le recrutement du complexe multiprotéique CBP/p300 et PCAF, des enzymes histones acétylases qui vont décondenser la chromatine au niveau du promoteur et faciliter le recrutement de la machinerie de transcription cellulaire notamment l'ARN polymérase II et le facteur de transcription TFIID, dont la sous-unité TBP va se fixer sur la séquence TATA. Ce recrutement ainsi que celui de P-TEFb est facilité par l'interaction de ces différents facteurs de transcription avec Tax. Ainsi la transcription peut commencer. Tax interagit également avec un autre complexe histone acétylase, SWI/SNF, qui pourrait permettre l'acétylation des histones et la décondensation de la chromatine légèrement en aval de l'ARNpol II pour favoriser son avancée. De plus la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II par P-TEFb va favoriser l'élongation de la transcription. Adapté de (Boxus et al., 2008).

En plus de recruter des co-facteurs transcriptionnels à activité histone acétylase tels que p300/CBP et PCAF, Tax favorise l'acétylation des histones et donc la forme décondensée de la chromatine en interagissant avec l'histone déacétylase HDAC-1, l'empêchant ainsi de se lier au promoteur et/ou l'en dissociant (Lu et al., 2004).

Enfin, outre sa capacité à activer l'initiation de la transcription à partir du promoteur viral, Tax pourrait également favoriser l'élongation de cette transcription. Tax interagit avec la kinase dépendante des cyclines CDK9 (*Cyclin-dependent kinase*) et la cycline T1, les deux sous-unités du complexe P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) et recrute ce complexe sur le promoteur viral (Zhou et al., 2006). Tax favorise ainsi la phosphorylation de

la sérine 2 du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, une modification importante pour la progression de la transcription (Cho et al., 2007). Une interaction entre Tax et BGR1, une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, a été montrée et favoriserait la transactivation du promoteur HTLV par Tax. Ce complexe pourrait cibler les histones en aval de l'ARN polymérase II pour faciliter son passage en décondensant la chromatine (Easley et al., 2010; Wu et al., 2004) (**Figure 18**).

Le LTR 3', bien que présentant la même distribution de facteurs activateurs, notamment Tax, CREB, CBP, p300..., ne contient pas de séquence TATA nécessaire à la fixation du facteur de transcription TBP notamment (Lemasson et al., 2004; Yoshida et al., 2008). Il pourrait donc être moins efficace que le LTR 5' pour initier la transcription puisque la présence de la séquence TATA et des TRE est nécessaire pour l'activation optimale du LTR proviral (Ching et al., 2004).

La protéine Tax active donc la transcription à partir des promoteurs viraux. Cependant, une fois transcrits, les ARNm viraux doivent atteindre le cytoplasme pour être traduits et former les protéines des nouveaux virions ou tout simplement entrer dans la composition des nouvelles particules virales en tant que génome viral pour les ARNm de longueur génomique. Or, dans les cellules eucaryotes, l'export des ARNm à travers les pores nucléaires est le plus souvent couplé à l'épissage des ARN. Ainsi, les ARNm viraux doublement épissés sont bien exportés dans le cytoplasme. Les protéines Tax et Rex sont donc traduites rapidement dans les cellules infectées. La protéine Rex va ensuite permettre l'export des ARNm non épissés ou simplement épissés et donc la traduction des protéines structurales et enzymatiques qui formeront les nouvelles particules virales (Hidaka et al., 1988). Pour agir, Rex a besoin de la présence d'un élément de réponse à Rex, RxRE, à l'extrémité 3' des ARNm (Seiki et al., 1988). Cette séquence est en fait très structurée, avec 4 tiges boucles et une longue tige (Toyoshima et al., 1990). Un élément de réponse comparable a également été identifié à l'extrémité 5' des ARNm viraux (Askjaer and Kjems, 1998). Pour exporter les ARNm incomplètement épissés, Rex, probablement sous forme multimérique, interagit de façon directe avec les ARNm via les structures RxRE et avec l'exportine 1 (CRM1, *Chromosome Region Maintenance 1*) grâce à son signal d'export nucléaire (Bogerd et al., 1991; Hakata et al., 1998; Palmeri and Malim, 1996). Outre sa capacité à faciliter l'export des ARNm, Rex peut également augmenter la stabilité des ARNm et faciliter la traduction des ARNm non complètement épissés tout en diminuant l'épissage

des ARNm viraux (Grone et al., 1996). La protéine Rex favorise donc l'expression des protéines structurales et enzymatiques pour former de nouveaux virions et au contraire diminue sa propre expression et surtout celle du transactivateur viral, Tax.

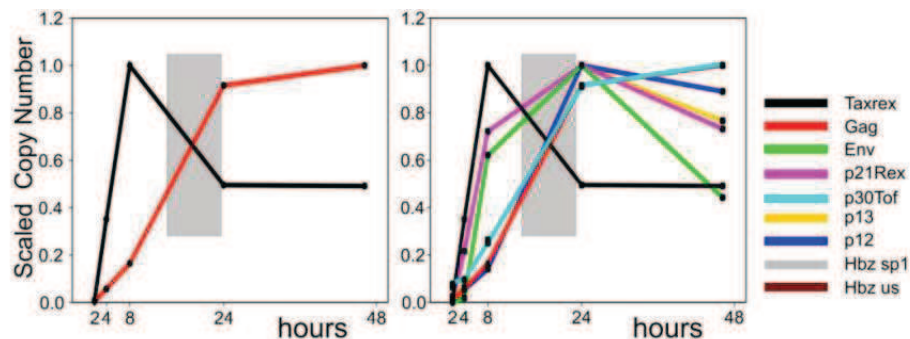


FIGURE 19 : CINETIQUE D'EXPRESSION DES ARNm VIRAUX

Nombre de copies des ARNm viraux quantifiées par RT-PCR après 8h, 24h et 48h de culture de cellules de patients souffrant de leucémie à cellules T de l'adulte. Le graphe de gauche représentant la quantité d'expression uniquement des ARNm *tax/rex* et *gag* montre clairement les deux types de cinétiques d'expression des gènes viraux. Les ARNm *tax/rex* s'accumulent rapidement pendant une phase précoce puis diminuent aussi rapidement alors que les ARNm *gag* s'accumulent plus progressivement mais restent ensuite stable dans le temps. La quantification des autres ARNm permet d'observer que la plupart des gènes viraux présentent une cinétique d'expression similaire à celle de *gag*. Ainsi deux phases d'expression se distinguent : une phase précoce durant laquelle s'exprime surtout les gènes *tax* et *rex* et une phase tardive avec l'expression des protéines structurales et enzymatiques. La transition entre les deux phases schématisée par le cadre gris sur les deux graphes implique essentiellement la protéine Rex. D'après (Rende et al., 2011).

Ainsi, alors que la protéine Tax régule l'expression du génome viral au niveau transcriptionnel, la protéine Rex la régule au niveau post-transcriptionnel. L'ensemble de ces régulations aboutit à une expression du génome viral en deux phases qu'une étude récente a mis en évidence en quantifiant tous les ARNm viraux produits au cours du temps dans des cellules de patients mises en culture *ex vivo* (Figure 19) (Rende et al., 2011). Lors de la phase précoce, les ARNm *tax/rex* sont les ARNm les plus abondants et majoritairement traduits car pouvant être exportés dans le cytoplasme suite à leur épissage. Or le taux de traduction des deux protéines à partir de cet unique ARNm n'est pas équivalent. La séquence Kozak, qui entoure le codon initiateur de l'ORF IV étant plus efficace, la protéine Tax est plus traduite que la protéine Rex (Rosenblatt et al., 1988). La protéine Tax fortement traduite peut donc efficacement transactiver le promoteur viral et induire la transcription efficace des ARNm viraux. En absence de Rex, les ARNm doublement épissés *tax/rex* sont plus efficacement produits menant à une accumulation progressive de Rex. Avec l'augmentation de Rex dans le noyau, les ARNm non épissés ou simplement épissés sont progressivement plus transcrits au

détriment des ARNm *tax/rex* dont la quantité chute dans la cellule alors que la quantité des autres ARNm atteint un plateau et reste stable. Rende et al. ont confirmé le rôle prépondérant de Rex dans la régulation de cette cinétique en deux phases (Rende et al., 2011). Ainsi, la protéine Rex contrôle la cinétique d'expression des différents gènes viraux en contrôlant la localisation des ARNm.

Cependant, une étude très récente a remis en cause ce modèle en montrant que l'interaction de Rex sur les ARNm *tax/rex* favorisait également leur export nucléaire. Seule une petite fraction de ces ARNm pourrait être exportée indépendamment de Rex permettant ainsi l'initiation de la réplication virale avec la traduction de quelques protéines de Tax et de Rex (Bai et al., 2012).

Par contre, la protéine auxiliaire p30 pourrait jouer le rôle de régulateur temporel de l'expression du génome proviral. En effet, Nicot *et al.* ont mis en évidence que p30, protéine nucléaire et nucléolaire, se lie spécifiquement à l'ARNm *tax/rex* au niveau de la jonction de deux exons et le retient ainsi dans le nucléoplasme (Ghorbel et al., 2006; Nicot et al., 2004). L'interaction entre p30 et l'ARNm fait d'ailleurs intervenir un troisième partenaire : Rex (Sinha-Datta et al., 2007).

4. LA FORMATION DE LA PARTICULE VIRALE : AVANT ET APRES LE BOURGEONNEMENT

Pour que les nouveaux virions puissent s'assembler, l'ensemble des constituants doivent être rassemblés au même endroit.

Les protéines d'enveloppe sont traduites grâce aux ribosomes associés au réticulum endoplasmique (RE) et donc insérées co-traductionnellement dans le RE. Dans ce compartiment cellulaire, les précurseurs d'enveloppe vont subir de nombreuses modifications : oligomérisation en trimères, repliement, et N-glycosylations (Rosenberg et al., 1999). Les protéines Env passent ensuite dans l'appareil de Golgi où elles sont clivées par une protéase cellulaire de la famille des furines pour donner les deux sous-unités SU et TM. Les trimères de glycoprotéines matures sont ensuite exportés vers la membrane plasmique où ils sont insérés.

Les précurseurs Gag, Gag-Pro ou Gag-Pro-Pol sont quant à eux traduits dans le cytoplasme. Co-traductionnellement, l'acide aminé N-terminal est modifié avec l'ajout d'un groupement myristate hydrophobe. La myristoylation de la protéine va permettre son

adressage et son ancrage dans la membrane plasmique lieu de l'assemblage avec les glycoprotéines d'enveloppe. Le domaine MA permet de faire le lien entre le précurseur Gag et la queue cytoplasmique des glycoprotéines d'enveloppe. Alors que ces étapes sont souvent considérées équivalentes à ce qui se passe pour le virus VIH, des différences ont été clairement mises en évidence. D'abord, les acides aminés basiques dans la région N-terminale du domaine MA ne semblent pas aussi importants pour l'adressage du précurseur Gag à la membrane plasmique (Le Blanc et al., 1999). De plus, l'oligomérisation nécessaire à la formation des particules virales n'a lieu qu'après l'ancrage de Gag au niveau de la membrane plasmique et non dans le cytoplasme comme pour le VIH (Fogarty et al., 2011a). Cette oligomérisation implique différentes régions du précurseur Gag. L'extrémité C-terminale du domaine CA est impliquée dans cette oligomérisation (Rayne et al., 2001). Le domaine MA est également impliqué grâce à des interactions non-covalentes mais également à la formation d'un pont disulfure entre domaines MA de deux précurseurs Gag. Ces ponts disulfures commencent à se former lorsque les précurseurs sont au niveau de la membrane plasmique. Cependant, leur formation est favorisée au sein des particules virales qui sont sorties de la cellule et donc se retrouvent dans un environnement moins réducteur que le milieu intracellulaire (Rayne et al., 2004). Enfin il est à noter que les précurseurs Gag ne s'ancrent pas n'importe où dans la membrane plasmique mais ciblent des microdomaines riches en tétraspanines et notamment CD82 (Mazurov et al., 2006). Ceci permet de concentrer les précurseurs Gag dans une zone restreinte.

Les glycoprotéines d'enveloppe gp46 et gp21 et les précurseurs Gag, Gag-Pro ou Gag-Pro-Pol s'associent donc au niveau de la membrane plasmique où doit également être recruté le génome viral. Certains ARNm de longueur génomique, transcrits et exportés dans le cytoplasme avec l'aide de la protéine Rex, vont pouvoir s'associer avec le domaine NC du précurseur Gag bien que la nucléocapside du virus HTLV ait une capacité à lier les acides nucléiques plus faible que celle du virus VIH (Morcock et al., 2000).

En parallèle de l'association de tous les composants de la particule virale, les nouveaux virions bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique pour finalement sortir de la cellule-hôte. Comme chez de nombreux rétrovirus, un domaine consensus d'assemblage tardif est présent dans le domaine MA : PPPY, important pour la libération des virions en bourgeonnement. Ce motif permet le recrutement de protéines de la famille Nedd-4, notamment Nedd-4.1 et Tsg101, entraînant l'ubiquitinylation de Gag (Blot et al., 2004;

Heidecker et al., 2004). Un autre motif est également présent à quelques acides aminés d'intervalle du premier, PTAP, mais son rôle dans la libération des virions est plus controversé (Heidecker et al., 2004; Wang et al., 2004).

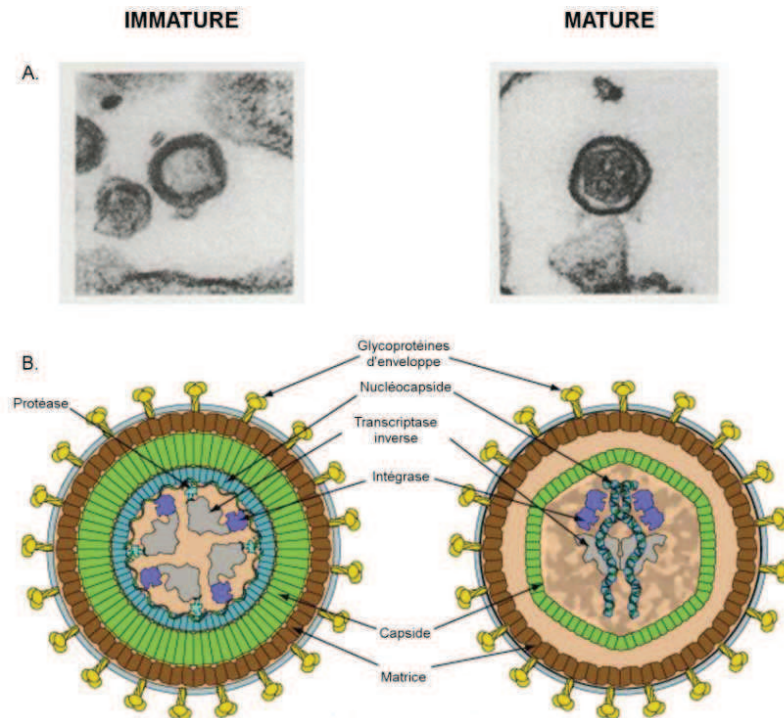


FIGURE 20 : MATURATION DE LA PARTICULE VIRALE

A. Particule virale immature (gauche) et mature (droite) observée en microscopie électronique. D'après (Coffin et al., 1997).

B. Schéma de la maturation de la particule virale avec à gauche une particule virale immature et à droite une particule virale mature. Adapté de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/60.html.

Après la libération des nouveaux virions, il reste une étape de maturation des particules virales. Durant cette étape, la protéase virale clive les précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol pour libérer toutes les protéines virales. Une complète réorganisation très visible en microscopie électronique donne naissance à la particule virale mature telle qu'elle a été présentée dans la partie II-A-1 (**Figure 20**).

C. CELLULES CIBLES DU VIRUS : ESSENTIELLEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES

Le virus HTLV peut infecter de nombreuses cellules mais comme son nom l'indique, il infecte préférentiellement les lymphocytes T.

1. LES LYMPHOCYTES T

a) CD4+/CD8+ : un tropisme différent pour les virus HTLV-1 et HTLV-2

Les virus HTLV-1 et HTLV-2 sont détectés à la fois dans les lymphocytes T (L_T) CD4+ et CD8+ chez les personnes infectées. Cependant, le virus HTLV-1 infecte préférentiellement les L_T CD4+ puisque jusqu'à 90% des provirus HTLV-1 sont présents dans ces cellules (Richardson et al., 1990). Les L_T CD8+, et notamment ceux ciblant spécifiquement les antigènes du virus HTLV-1, sont également infectés et pourraient constituer un réservoir pour le virus HTLV-1 (Hanon et al., 2000b; Nagai et al., 2001). Le tropisme préférentiel du virus HTLV-2 semble au contraire être les L_T CD8+ même si, comme pour HTLV-1, ces cellules ne sont pas les seules infectées chez les patients (Lal et al., 1995). De plus, il a été montré *in vitro* que HTLV-2 est capable d'infecter de façon équivalente les L_T CD4+ et CD8+ (Wang et al., 2000).

Cette différence de tropisme entre HTLV-1 et HTLV-2 est corrélée aux différences observées dans l'utilisation des récepteurs cellulaires. En effet, les L_T CD4+ présentent à leur surface beaucoup de HSPG et peu de récepteurs GLUT-1, au contraire des L_T CD8+ qui ont peu de HSPG et beaucoup de GLUT-1. Or, HTLV-2 n'est pas dépendant des HSPG pour s'attacher et entrer dans les cellules (Jones et al., 2006).

Bien que les deux virus soient capables d'infecter aussi bien les L_T CD4+ que les L_T CD8+, et notamment *in vitro*, HTLV-1 et HTLV-2 présentent par contre une différence majeure dans leur capacité à transformer ces cellules. HTLV-1 ne transforme que les L_T CD4+, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et HTLV-2 transforme très préférentiellement les L_T CD8+ *in vitro* (Morimoto et al., 1985; Persaud et al., 1995; Wang et al., 2000; Ye et al., 2003). Le déterminant de cette différence de tropisme a été localisé dans le gène *env* puisque des virus recombinants HTLV-1 avec le gène *env* remplacé par celui d'HTLV-2 transforment préférentiellement des L_T CD8+ alors qu'HTLV-2 avec l'enveloppe d'HTLV-1 transforme préférentiellement les L_T CD4+ (Xie and Green, 2005). Une étude récente a complété notre compréhension de cette différence de tropisme. Après avoir confirmé l'absence de préférence lors de l'infection des L_T CD4+ ou CD8+ par les deux virus dans un modèle *in vivo* chez le lapin, un essai d'immortalisation des cellules sanguines primaires (PBMC, *Primary Blood Mononuclear cells*) a montré que la différence de tropisme résultait d'une spécificité d'induction de la prolifération d'un seul type de lymphocytes par chaque HTLV. En effet, après 4 à 5 semaines de culture des PBMC en présence du virus HTLV-1 ou HTLV-2, un type

de lymphocytes apparaît clairement proliférer de façon plus efficace que l'autre, les L_T CD4+ et les L_T CD8+ respectivement, et cette différence ne fait que s'accroître au cours du temps (**Figure 21**) (Kannian et al., 2012).

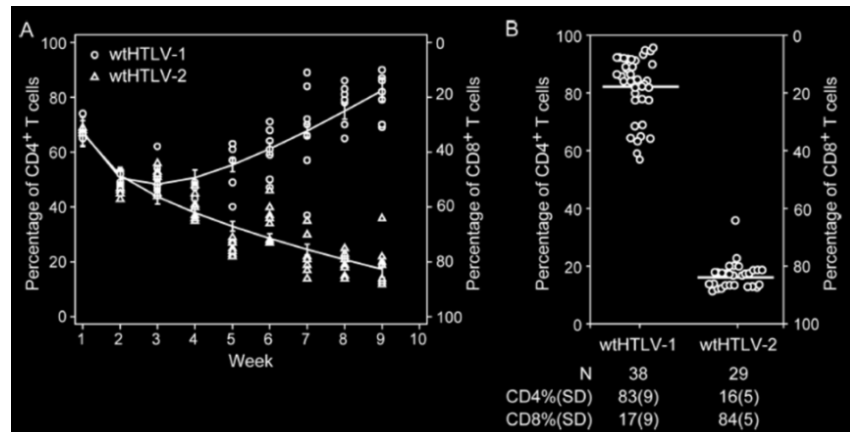


FIGURE 21 : LES VIRUS HTLV-1 ET HTLV-2 INDUISENT SPECIFIQUEMENT L'IMMORTALISATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ ET T CD8+ RESPECTIVEMENT.

Des PBMC sont mis en co-culture avec des cellules productrices de HTLV-1 ou HTLV-2 pendant 9 semaines. Chaque semaine le pourcentage de cellules CD4+ et CD8+ dans cette co-culture est mesuré par cytométrie en flux et normalisé à 100%. (A) Ces pourcentages sont représentés en fonction du temps dans les 8 puits mesurés chaque semaine. La différence entre les pourcentages des deux cultures est significative à partir de la première semaine. (B) Les pourcentages de L_T CD4+ et CD8+ après 9 semaines de co-culture sont représentés et les valeurs moyennes sont indiquées en-dessous avec les valeurs de déviation standard entre parenthèses. D'après (Kannian et al., 2012)

b) HTLV-1 et les L_T CD4+ : oui, mais pas n'importe lesquels !

Le tropisme du virus HTLV-1 a pu être précisé. En effet, les L_T CD4+ regroupent en fait de nombreuses sous-populations. Il a d'abord été montré que le virus HTLV-1 infectait principalement les L_T activés c'est-à-dire présentant le marqueur CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, à leur surface (Yamano et al., 2004). Là-encore, la corrélation existe avec ce qui a précédemment été montré pour les récepteurs utilisés par le virus à la surface de la cellule hôte. Alors que HTLV-1 est incapable de s'attacher aux L_T naïfs (Manel et al., 2003b; Nath et al., 2003), la protéine NRP-1 est augmentée à la surface des L_T suite à leur activation (Milpied et al., 2009). Une étude a cependant montré que le virus pouvait se lier à des L_T naïfs mais après traitement des cellules avec du TGF β qui induit l'expression de GLUT-1 à la surface des L_T naïfs (Jones et al., 2005). Non seulement HTLV-1 ne lie pas les L_T naïfs mais le virus diminue également leur nombre chez les personnes infectées (Yasunaga et al., 2001).

Parmi les L_T CD4+ activés, différentes sous-populations semblent être ciblées par le virus HTLV-1. Notamment, les L_T mémoires dont le marqueur principal est CD45RO semblent

particulièrement infectés par HTLV-1 (Richardson et al., 1990). Asquith *et al.*, grâce au suivi de la dynamique des populations lymphocytaires *in vivo*, ont notamment montré que cette sous-population se multipliait de façon bien supérieure chez des personnes infectées que chez des personnes saines (Asquith et al., 2007).

Cependant, une autre sous-population lymphocytaire a également été présentée comme cible du virus HTLV-1 : les lymphocytes T régulateurs (Treg). En effet, les L_T infectés par le virus HTLV-1, que ce soit chez des patients souffrants de leucémie ou de myélopathie, présentent pour la plupart le récepteur aux chimiokines CCR4 à leur surface (Yamano et al., 2009; Yoshie et al., 2002). Or il a été montré que Tax induisait la production de la chimiokine CCL22 par les cellules infectées (Hieshima et al., 2008; Toulza et al., 2010). Or CCL22 est le ligand de CCR4 et sa sécrétion par les L_T infectés pourrait donc attirer préférentiellement les L_T CD4⁺ CCR4⁺, expliquant la fréquence importante de L_T CD4⁺ CCR4⁺ parmi les lymphocytes infectés chez les patients.

CCR4 est le marqueur de deux sous-types principaux de L_T CD4⁺, les Th2 et les Treg. Or, les LT CD4⁺ Foxp3⁺ (facteur de transcription marqueur principal des Treg) semblent infectés de façon importante par le virus HTLV-1 (Satou et al., 2012). De plus, l'expression du facteur de transcription Foxp3 dans une proportion non négligeable de cellules ATL, des propriétés immunosuppressives ayant même parfois été montrées pour ces cellules, a été observée dans plusieurs études (Chen et al., 2006; Kohno et al., 2005; Roncador et al., 2005; Yano et al., 2007). Cependant, une étude récente a démontré que les nombreuses cellules Foxp3⁺ chez les individus atteints d'ATL n'étaient en fait pas les cellules leucémiques (Bangham and Toulza, 2011; Toulza et al., 2009).

L'importance que peut avoir l'infection de ces différentes sous-populations lymphocytaires dans le développement des maladies associées à HTLV-1 sera traitée un peu plus loin dans ce chapitre.

2. LES AUTRES CELLULES CIBLES

L'infection d'autres types cellulaires a également été détectée chez les personnes infectées par le virus HTLV-1. Cependant, ces cellules restent majoritairement des cellules du système immunitaire.

a) Les cellules immunitaires

La quantification des copies de génome proviral intégrées dans les différentes populations de cellules immunitaires a permis la détection d'une infection significative dans des cellules autres que les lymphocytes T : les lymphocytes B (L_B), les cellules dendritiques et les monocytes (Koyanagi et al., 1993). L'infection des monocytes a depuis été confirmée même si l'expression virale dans ces cellules semble plus faible que dans les L_T CD4+ (Enose-Akahata et al., 2008). Le génome viral a également été détecté dans des cellules T Natural Killer invariantes (iNKT) à raison d'environ 20 copies pour 100 cellules (Azakami et al., 2009).

Plusieurs études ont montré la possible infection des cellules dendritiques, aussi bien myéloïdes que plasmacytoïdes, par le virus HTLV-1 (Jones et al., 2008; Macatonia et al., 1992). En tant que cellules présentatrices d'antigènes, la fonction naturelle de ces cellules est d'interagir avec les L_T CD4+ et de les activer. De par leur relation privilégiée, les cellules dendritiques infectées favorisent la transmission du virus aux L_T CD4+ et leur transformation ultérieure. Il a été montré que l'infection des L_T CD4+ par les cellules dendritiques pouvait s'effectuer en *cis*, c'est-à-dire après infection productive des cellules dendritiques et production de nouveaux virions, ou en *trans*, sans qu'il y ait eu infection productive des cellules dendritiques qui ne font que capturer le virus pour le transmettre ensuite aux L_T CD4+ (Jones et al., 2008). Ainsi les cellules dendritiques pourraient jouer un rôle majeur dans la pathogenèse liée au virus HTLV-1.

Un de ces rôles a été très récemment mis en lumière dans une étude du passage de la barrière épithéliale intestinale par le virus. En effet, un des modes de transmission majeur du virus dans les populations humaines reste l'allaitement. Or, une fois le lait contaminé ingéré par l'enfant, le virus doit passer cette barrière intestinale pour atteindre ses cellules cibles, les L_T CD4+. Martin-Latil *et al.* ont utilisé un modèle d'épithélium *in vitro* pour comprendre le passage de cette barrière. En présence de cellules T infectées par le virus HTLV-1, la barrière épithéliale reste intacte et le virus n'infecte pas les cellules épithéliales. La particule virale peut par contre traverser la barrière épithéliale par un mécanisme de transcytose, c'est-à-dire via une vésicule d'endocytose à l'entrée et d'exocytose à la sortie de la cellule épithéliale. Cette transcytose n'a pas lieu si des particules virales seules sont mises en présence de la barrière épithéliale. Le déclenchement de ce processus nécessite donc une interaction entre le lymphocyte infecté et la cellule épithéliale. Ceci confirme l'importance du passage de cellules infectées dans le lait et non simplement de virus libres. Or sous

l'épithélium intestinal se trouvent justement des cellules dendritiques, dans les plaques de Peyer entre autres. Cette étude a montré, toujours *in vitro*, que suite à la transcytose, les particules virales pouvaient infecter de façon productive des cellules dendritiques présentes au niveau du pôle basal des cellules épithéliales (Martin-Latil et al., 2012) (**Figure 22**). A partir de là, les cellules dendritiques pourraient transmettre le virus à des L_T CD4+.

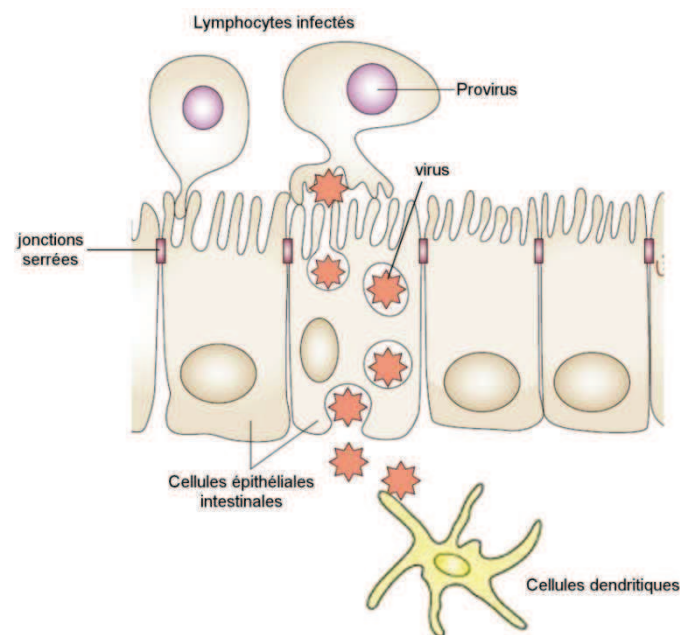


FIGURE 22 : MODELE DE LA TRANSCYTOSE DU VIRUS HTLV-1 A TRAVERS L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

A partir d'un contact entre une cellule infectée et le pôle apical d'une cellule épithéliale de la barrière intestinale, le virus HTLV-1 peut traverser la cellule épithéliale dans une vésicule, c'est-à-dire par transcytose, pour ressortir au niveau du pôle basal des cellules épithéliales. Sous l'épithélium intestinal, des cellules dendritiques des plaques de Peyer ou de la Lamina propria vont pouvoir être infectées par les particules virales et faire le relais avec les L_T CD4+. Adapté de (Bomsel and Alfsen, 2003).

b) Les autres cellules

L'infection d'autres cellules que les cellules du système immunitaire a également été observée. L'ARNm codant la protéine Tax a en effet été détecté dans des astrocytes chez 3 patients souffrant de myélopathie (Lehky et al., 1995). Il a été montré que l'infection d'astrocytes de rats ou humains était possible *in vitro* mais restait non productive et latente, suggérant une restriction de la réplication virale dans ces cellules (Szymocha et al., 2000a; Szymocha et al., 2000b).

L'infection des cellules endothéliales par HTLV-1 a été également démontrée *in vitro* (Hoxie et al., 1984). Alors qu'il avait déjà été suggéré que HTLV-1 pouvait infecter des cellules endothéliales cérébrales de rat *in vitro* (Romero et al., 2000), une étude a plus particulièrement montré que les cellules endothéliales humaines de la barrière hémato-

encéphalique pouvaient être infectées de façon productive par HTLV-1 *in vitro*, induisant une déstabilisation de cette barrière (Afonso et al., 2008).

D. SYSTEME IMMUNITAIRE CONTRE HTLV-1 : UN EQUILIBRE PRECAIRE

Contre tout agent pathogène, l'organisme a les moyens de se défendre. Tout d'abord, une réponse immunitaire innée se met en place rapidement mais est peu spécifique. Puis une réponse immunitaire adaptative prend plus de temps à se mettre en place mais est très spécifique et garde la mémoire de l'infection. Pour persister dans l'organisme, le virus HTLV-1 a de son côté les moyens de contrer ce système immunitaire.

1. UN ARSENAL POUR LUTTER CONTRE L'INFECTION PAR HTLV-1

a) Un rôle de l'immunité intrinsèque controversé

Hors des réponses immunitaires classiques, l'organisme possède un certain nombre de facteurs intracellulaires, exprimés de façon constante dans les cellules, qui peuvent bloquer de façon efficace et rapide l'infection des cellules par certains virus. Ce sont les facteurs de restriction.

Les protéines APOBEC3, famille de sept protéines, sont parmi les plus connues. Ces cytidines déaminases agissent sur le premier brin d'ADN synthétisé lors de la transcription inverse en transformant les cytidines en uridines. Ceci résulte en une hypermutation du brin de polarité positive avec des substitutions guanosine (G) vers adénosine (A) et un blocage de la suite du cycle de multiplication du virus. Alors que ces facteurs de restriction, et notamment APOBEC3G et APOBEC3F, sont très efficaces sur le virus VIH en absence de la protéine Vif, le rôle de ces déaminases sur le virus HTLV-1 est controversé. Des études ont démontré la résistance du virus HTLV-1 aux APOBEC3 (Navarro et al., 2005). Cette protéine, même si elle peut être présente dans la capsid virale, ne semble pas diminuer l'infectivité du virus (Ohsugi and Koito, 2007). Au contraire, une étude a montré que APOBEC3A, 3B et 3H étaient incorporées avec une faible efficacité dans les particules virales et capables d'inhiber l'infectivité de HTLV-1 (Ooms et al., 2012). Contrairement à APOBEC3A et 3B, l'activité cytidine déaminase de APOBEC3H n'est pas impliquée dans cette restriction. Une diminution de l'infection par HTLV-1 a également été observée par Sasada *et al.* lorsque APOBEC3G était présente dans la capsid virale mais là encore sans effet de l'activité

cytidine déaminase (Sasada et al., 2005). Pourtant certaines études ont montré une fréquence importante des substitutions G vers A dans le génome de HTLV-1, et notamment au niveau de paires de nucléotides, signature caractéristique des APOBEC3, suggérant un effet de ces protéines sur le génome de HTLV-1 (Fan et al., 2010; Mansky, 2000; Ooms et al., 2012). Il a cependant été évoqué que, au lieu de bloquer sa multiplication, le virus pourrait tirer avantage de l'hypermutation de son génome pour éteindre l'expression virale et échapper au système immunitaire (Fan et al., 2010). Enfin une étude permet de faire le lien entre ces résultats controversés : les APOBEC3B, 3C, 3F et 3G peuvent avoir un effet important *in vitro* sur certains génomes HTLV-1 mais de façon rare ce qui rend le phénomène très difficilement détectable *in vivo* (Mahieux et al., 2005).

Alors que le rôle des APOBEC3 *in vivo* ne semble pas être déterminant pour bloquer l'infection des cellules par HTLV-1, d'autres moyens de défense existent et ont été clairement mis en évidence.

b) Les Interférons de type I : la défense anti-virale par excellence

Les interférons de type I (IFN-I), IFN α et IFN β , sont des médiateurs antiviraux très efficaces. Produits et sécrétés par les cellules après la détection d'une infection, les IFN-I vont agir de façon autocrine ou paracrine. Par l'intermédiaire des récepteurs IFNAR-1 et IFNAR-2 et de la signalisation JAK (*Janus Kinase*)/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) qui en découle, l'expression de nombreux gènes va être induite dans les cellules voisines des cellules infectées, parmi lesquels de nombreux effecteurs antiviraux (**Figure 24B**). Ces cellules, voisines des cellules initialement infectées, vont donc être dans un état "antiviral" et bloquer la propagation du virus dans l'organisme.

En présence du virus HTLV-1, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), cellules productrices majeures d'IFN-I, produisent des doses importantes d'IFN α . Cette production ferait suite à la détection de l'ARN viral dans les cellules par le récepteur Toll de type 7 ou TLR7 (*Toll-like Receptor*) présent sur la membrane des endosomes (Colisson et al., 2010). Or l'effet de l'IFN α sur la réplication virale du virus HTLV-1 avait été précédemment démontré : même si l'inhibition est moins forte que pour le virus VIH, elle est réelle (Kinpara et al., 2009; Mahieux and Hermine, 2005). Ainsi, après la détection du virus par les cellules dendritiques, les cellules voisines seront dans un état antiviral qui limitera la multiplication du virus.

Un autre effet du virus HTLV-1 sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes a été observé : l'induction de l'expression à la surface cellulaire d'un grand nombre de ligands induisant l'apoptose et apparentés au TNF, TRAIL (*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand*), mobilisés à partir d'un stock intracellulaire. Les pDC ainsi activées sont alors capables de tuer par apoptose les L_T CD4⁺ exprimant le récepteur DR5, cellules cibles potentielles du virus HTLV-1 (Colisson et al., 2010).

Outre les cellules dendritiques, d'autres cellules de l'immunité innée ont également été étudiées pour leur rôle dans le contrôle de l'infection par HTLV-1. Une étude *in vitro* a démontré que des lignées cellulaires dans lesquelles le génome viral s'exprime étaient sensibles à la lyse induite par les cellules Natural Killer (NK), au contraire des cellules n'exprimant pas le génome viral (Stewart et al., 1996). D'autre part, la stimulation *in vitro* de cellules iNKT par de l'alpha-galactosylceramide induit la diminution du nombre de cellules T infectées, suggérant également un rôle des cellules iNKT dans la défense immunitaire contre la propagation du virus HTLV-1 (Azakami et al., 2009).

c) La protéine Tax, la cible préférée de la réponse immunitaire adaptative cellulaire

Après l'action de la réponse immunitaire innée et notamment grâce aux nombreuses cytokines et chimiokines sécrétées à cette occasion, la réponse immunitaire adaptative se met en place. Contrairement à la réponse innée qui détecte la présence du virus dans son ensemble dans les cellules, la réponse adaptative va s'appuyer sur la reconnaissance d'antigènes bien spécifiques de ce virus.

La réponse anticorps, tout d'abord, existe chez toutes les personnes infectées. C'est d'ailleurs sur cette réponse que repose le test de dépistage des personnes infectées en mettant en évidence la séroconversion des patients. Les premiers anticorps à apparaître sont dirigés contre la protéine Gag et restent majoritaires pendant environ deux mois. Des anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe apparaissent ensuite et enfin, chez 50% des personnes infectées, des anticorps dirigés contre la protéine Tax sont détectés (Bangham, 2000). L'efficacité de ces anticorps dans la protection de l'organisme contre l'infection par le virus HTLV-1 n'a pas été réellement évaluée. Cependant, de façon classique, les anticorps, notamment en se liant aux glycoprotéines d'enveloppe, peuvent avoir une action neutralisante, empêchant les virus d'interagir avec leurs récepteurs cellulaires et donc

d'infecter de nouvelles cellules. En recouvrant la particule virale par un processus d'opsonisation, les anticorps peuvent également faciliter sa phagocytose et donc sa destruction.

Bien que la réponse humorale anti-HTLV-1 existe, il semble que la réponse adaptative la plus efficace soit la réponse cellulaire. En effet, les L_T CD8+ ou L_T cytotoxiques (LT_C) dirigés contre le virus HTLV-1 sont très abondants chez les personnes infectées et peuvent même représenter jusqu'à 10% des LT_C circulants chez les patients atteints de myélopathie (Bieganowska et al., 1999; Jacobson et al., 1990; Parker et al., 1992). Des LT_C dirigés contre les protéines Env et Gag ont été détectés (Elovaara et al., 1993). Des LT_C dirigés contre les protéines auxiliaires p12 et p13 ont également été identifiés chez les personnes infectées, confirmant l'expression de ces protéines *in vivo* (Pique et al., 2000). Cependant, la très grande majorité de ces LT_C reconnaissent en fait la protéine Tax (pour revue (Bangham and Osame, 2005)). Plus important, ces LT_C sont efficaces pour tuer des L_T CD4+ infectés par le virus HTLV-1 *in vitro* grâce à une injection de perforine et granzymes dans ces cellules (Hanon et al., 2000a) (**Figure 23**). Les L_T CD8+ pouvant également être infectés par le virus HTLV-1, il a également été montré que ces cellules pouvaient être lysées par des LT_C anti-HTLV-1 autologues, les auteurs de l'étude qualifiant ce processus de fratricide (Hanon et al., 2000b). Plus récemment, des LT_C dirigés contre la protéine HBZ du virus HTLV-1 ont été mis en évidence chez des personnes infectées, en particulier chez les personnes atteintes de myélopathie (Hilburn et al.). La présence de ces LT_C étant corrélée à une charge provirale plus faible chez ces personnes, cela suggère une efficacité de ces LT_C pour combattre la propagation du virus HTLV-1 (Macnamara et al., 2010). Cependant, les LT_C anti-HBZ ne semblent pas capables de tuer des cellules de patients souffrant d'ATL (Suemori et al., 2009).

Le blocage efficace par les LT_C de la propagation du virus HTLV-1 peut reposer sur plusieurs mécanismes (**Figure 23**). Dans tous les cas, il y a reconnaissance d'une cellule infectée qui présente des antigènes viraux, donc étrangers, sur le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I). Grâce à son récepteur spécifique (TCR, *T Cell Receptor*), le LT_C interagit avec le CMH-I et l'antigène viral à la surface de la cellule infectée. Cette interaction, appelée synapse virologique est facilitée par l'interaction de la molécule CD8 avec le CMH-I mais également par l'engagement de molécules d'adhésion à la surface des deux cellules. Le LT_C peut ensuite induire la mort de la cellule infectée de 2 manières : l'exocytose de granules contenant perforine et granzymes, comme cela a été décrit par

Hannon *et al.*, ou par la voie des récepteurs de mort (**Figure 23**). Les granzymes sont des sérines protéases et la granzyme B induit notamment l'apoptose des cellules par clivage de la procaspase 3 en caspase 3 et de la molécule pro-apoptotique Bid. Les perforines sont des protéines qui s'insèrent dans la membrane et vont permettre l'entrée des granzymes dans le cytoplasme des cellules infectées même si le mécanisme exact n'est pas encore clair. La voie des récepteurs de mort est quant à elle induite par l'engagement des récepteurs de mort (récepteurs au TNF ou Fas) à la surface des cellules infectées avec leurs ligands respectifs (TNF- α ou FasL) présents à la surface du LT_C. La signalisation qui en découle aboutit à l'apoptose de la cellule infectée comme dans le cas de la voie perforine-granzyme. Les LT_C éliminent donc le virus en éliminant les cellules infectées. Il est à noter que les LT_C produisent également beaucoup d'IFN γ , interféron de type 2, qui, comme les interférons de type 1, a un effet inhibiteur sur la multiplication virale. Les LT_C peuvent donc également agir par ce biais sur la propagation du virus.

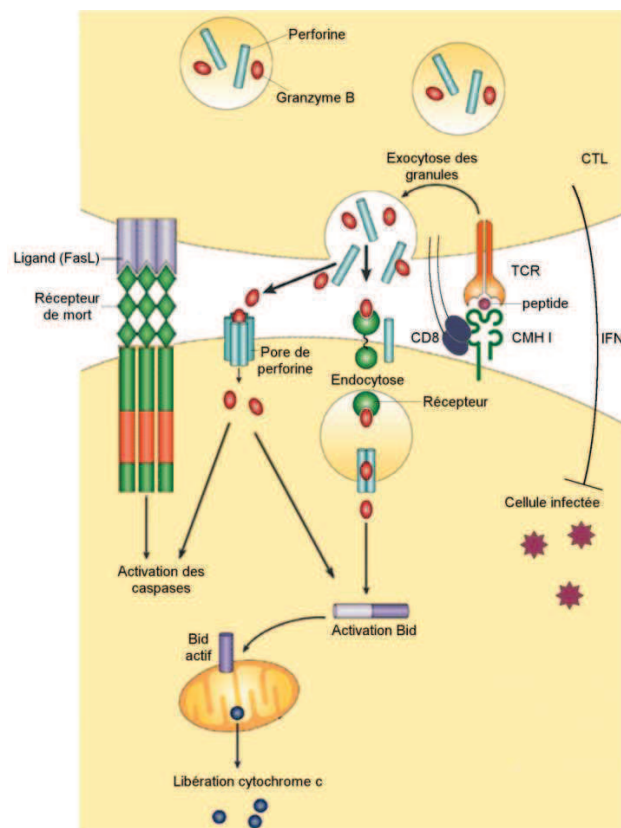


FIGURE 23 : EFFET D'UN LYMPHOCYTE T CYTOTOXIQUE SUR UNE CELLULE INFECTÉE PAR UN VIRUS

Le lymphocyte T cytotoxique (CTL) peut bloquer la propagation d'un virus de trois manières différentes. Il peut inhiber la multiplication virale en sécrétant de l'IFN γ . Il peut aussi induire la mort des cellules infectées par apoptose empêchant la production de nouveaux virions et ce de deux manières. Cette apoptose peut être induite par l'activation des récepteurs de mort (Fas) à la surface des cellules infectées ou par libération par le LT_C et entrée dans la cellule cible de perforine et granzymes, notamment granzyme B. Adapté de (Barry and Bleackley, 2002).

2. STRATEGIES D'ECHAPPEMENT AU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le virus HTLV-1 induit une infection persistante des individus puisque le virus reste à vie dans l'organisme. HTLV-1 peut donc échapper aux réponses immunitaires mises en place suite à l'infection et dispose pour cela de différentes stratégies.

a) Contre-mesures à la réponse immunitaire

De nombreux dysfonctionnements des réponses immunitaires présentées précédemment ont été observés chez les personnes infectées par le virus HTLV-1.

Alors que l'effet activateur de la production d'IFN α du HTLV-1 sur les pDC a été mis en évidence *in vitro*, les pDC des personnes infectées, et notamment des patients souffrant d'ATL, semblent avoir un défaut de production d'IFN α , associé à un défaut du nombre de cellules pDC parmi leurs PBMC (Hishizawa et al., 2004). Au niveau moléculaire, cette observation est corrélée à une augmentation de l'expression et de la stabilité de SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) par Tax *in vitro* (Charoenthongtrakul et al., 2011). Or il a été montré que SOCS1 favorise la dégradation de IRF3 (*Interferon Regulatory Factor*) et donc bloque l'expression des IFN-I (Oliere et al., 2010) (**Figure 24A**). Pourtant il avait également été montré que Tax activait de façon constitutive IRF3 (Suzuki et al., 2010). Mais ce résultat a été obtenu dans des lignées cellulaires de laboratoire qui expriment certainement beaucoup de protéines virales alors que Olière *et al.* ont obtenu leurs résultats dans des cellules primaires transfectées avec un provirus HTLV-1 induisant probablement une expression virale plus faible.

Cette production d'IFN, si importante pour la lutte antivirale de l'organisme, peut encore être jugulée à d'autres niveaux par HTLV-1 par l'intermédiaire des micro-ARN (miARN). HTLV-1 modulent en effet l'expression des miARN cellulaires (pour revue (Bouzar and Willems, 2008)). En particulier, les miARN-146 et -155 sont surexprimés dans les cellules infectées par HTLV-1 (Bellon et al., 2009; Pichler et al., 2008). Or miARN-146 cible et supprime l'expression de TRAF6, IRAK1 (*IL-1R-Associated Kinase 1*) et IRAK2 alors que miARN-155 cible IKK ϵ , une protéine impliquée dans la signalisation IFN (Hou et al., 2009; Tili et al., 2007) (**Figure 24A**).

En plus d'empêcher une cellule infectée de prévenir ses voisines en produisant de l'IFN-I, le virus HTLV-1 est capable en deuxième ligne d'empêcher les cellules d'activer leurs

défenses antivirales même après réception d'un signal IFN-I. Le virus bloque en effet la signalisation en aval du récepteur à l'interféron (IFNR) notamment par l'intermédiaire de SOCS1, inhibiteur reconnu de la voie de signalisation IFN (**Figure 24B**). SOCS1 inhibe en effet la phosphorylation de STAT1 et JAK1 (Oliere et al., 2010). Une autre étude a également montré cette inhibition de la voie de signalisation de l'IFN par HTLV-1 mais avec un défaut de phosphorylation de la Tyrosine kinase 2 (Tyk2) et de STAT2 et de façon indépendante de Tax (Feng and Ratner, 2008). Enfin, un autre effet de Tax, indépendamment de SOCS, peut inhiber l'expression des gènes répondant à l'IFN par l'intermédiaire du complexe activateur de transcription ISG3 (*IFN-Stimulated Gene factor 3*). En interagissant et en séquestrant les co-activateurs CBP/p300, Tax empêche la formation de ce complexe ISG3 (Zhang et al., 2008) (**Figure 24B**).

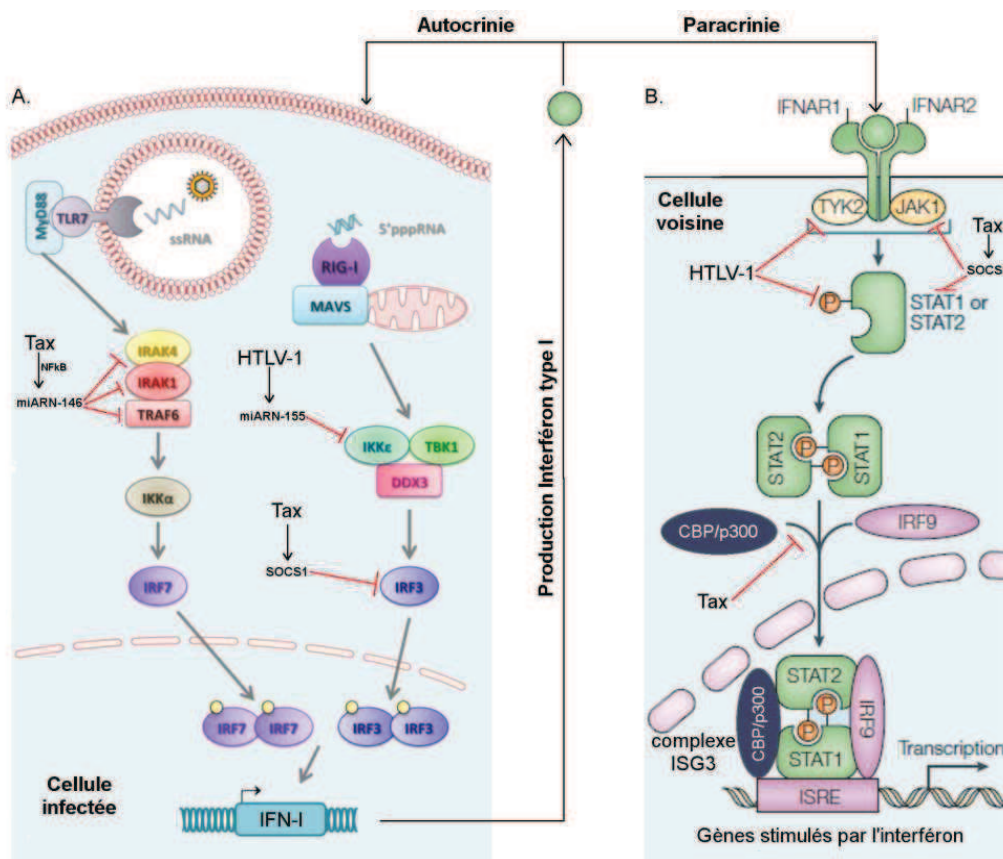


FIGURE 24 : L'INTERFERON DE TYPE I ET LE VIRUS HTLV-1

A. Après la détection du virus dans la cellule infectée, une signalisation se met en place pour aboutir à la production d'interféron de type I, molécule très importante dans la lutte anti-virale. L'IFN-I produit peut ensuite agir de façon autocrine et paracrine pour activer des effecteurs anti-viraux dans les cellules. Mais le virus HTLV-1 par le biais de différents intermédiaires peut inhiber cette production d'IFN-I à différents niveaux de la signalisation. Adapté de (Oliere et al., 2011).

B. Signalisation en aval de la fixation de l'IFN-I sur son récepteur pour aboutir à la stimulation de l'expression des effecteurs anti-viraux. Là encore, le virus HTLV-1 peut interférer avec cette signalisation à différents niveaux. Adapté de (Platanias, 2005).

Le virus HTLV-1 peut également altérer la fonction des cellules iNKT en diminuant la production de perforine (Azakami et al., 2009). Mais outre l'altération de la fonction des cellules impliquées dans l'immunité innée, l'infection par le virus HTLV-1 induit également la diminution du nombre de ces cellules (Azakami et al., 2009). Aussi bien le nombre de cellules dendritiques, que de cellules NK et de cellules iNKT est diminué chez des personnes infectées par le virus HTLV-1 (Hishizawa et al., 2004; Ndhlovu et al., 2009; Yu et al., 1991).

Les stratégies pour échapper à la deuxième vague du système immunitaire, la réponse adaptative, existent aussi. Pour éviter la reconnaissance des cellules infectées par les LT_C, la protéine p12 est capable de bloquer l'expression du CMH-I à la surface des cellules (Johnson et al., 2000). p12 interagit dans le réticulum endoplasmique avec la chaîne lourde du CMH-I et empêche ainsi son interaction avec la β 2-microglobuline. La chaîne lourde est alors rétrotransloquée dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome (**Figure 25**). Bien sûr, l'absence de CMH-I à la surface des cellules est un signal activateur pour les cellules NK mais dans la cellule infectée, la protéine p12 réduit également l'expression à la surface des autres molécules activatrices des cellules NK (NCR et NKG2D) et des molécules permettant l'adhérence des cellules NK aux cellules infectées (ICAM-1 et ICAM-2) (Banerjee et al., 2007). Les cellules infectées échappent ainsi à la lyse par les LT_C et par les cellules NK.

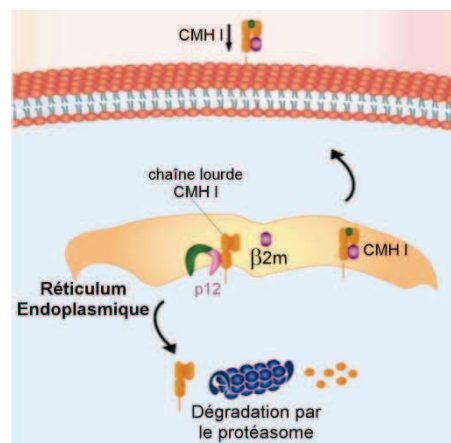


FIGURE 25 : P12 REDUIT L'EXPRESSION DU CMH-I A LA SURFACE CELLULAIRE

p12 interagit dans le réticulum endoplasmique avec la chaîne lourde du CMH I et empêche l'interaction de celle-ci avec la β 2-microglobuline. La chaîne lourde est alors rétrotransloquée dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome. Adapté de (Van Prooyen et al., 2010).

b) La transmission cellule-cellule : un jeu de cache-cache

Très peu de virions sont retrouvés de façon libre dans le plasma des patients infectés par le virus HTLV-1 et la contamination suite à des transfusion requiert le passage de cellules

infectées (Okochi et al., 1984). De même, l'infection des cellules par des virions libres s'est toujours révélée très difficile *in vitro* (Yamamoto et al., 1982) alors que la transmission par co-culture de cellules infectées et de cellules non infectées est très efficace, suggérant une importance des contacts cellulaires pour la transmission du virus HTLV-1. De plus, les cellules infectées produisent très peu de particules virales infectieuses libres (Derse et al., 2001; Fan et al., 1992). Toutes ces observations ont conduit à explorer des mécanismes de transmission cellule-cellule.

La preuve directe d'une transmission cellule-cellule n'a été obtenue qu'en 2003 par Igakura *et al.* qui ont montré que les L_T CD4⁺ et CD8⁺ pouvaient former des conjugués et que la formation de ces conjugués permettait le passage de composants viraux (Gag et ARN viral) d'une cellule infectée à une cellule non infectée (Igakura et al., 2003). Cette transmission de cellule à cellule implique une polarisation du cytosquelette et plus précisément du centre organisateur des microtubules (MTOC, *Microtubule Organizing Center*), ainsi que des protéines Env et Gag et des ARN viraux au niveau des contacts cellule-cellule (**Figure 26**). Pour atteindre ces contacts cellulaires, Gag a besoin du cytosquelette et notamment des microtubules puisque le nocodazole, qui détruit le réseau de microtubules, empêche cette polarisation de Gag au contact cellule-cellule. L'observation d'un regroupement de Taline, une protéine impliquée dans les adhérences cellulaires, au niveau de ces contacts cellule-cellule, et souvent en forme d'anneau autour du cluster de Gag, ainsi que la polarisation du MTOC ont conduit à une comparaison avec la synapse immunologique. Par analogie, ces contacts cellulaires permettant le passage du virus d'une cellule infectée à une autre non infectée ont été appelés « synapse virologique » (**Figure 26**). Depuis cette première mise en évidence, les mécanismes d'induction de cette synapse virologique sont un peu mieux compris. Après un contact cellulaire, un signal d'origine virale induit par Tax, et un signal d'origine cellulaire induit par ICAM-1, entraînent la polarisation du MTOC et des composants viraux (Barnard et al., 2005; Nejmeddine et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que la protéine p8, résultat du clivage de p12, favorisait : le regroupement de protéines LFA-1 à la surface des cellules, l'adhérence des cellules et la formation de conjugués ainsi que la transmission du virus HTLV-1 (Van Prooyen et al., 2010). Ceci confirme l'importance des molécules d'adhérence dans l'efficacité de la synapse virologique (**Figure 26**).

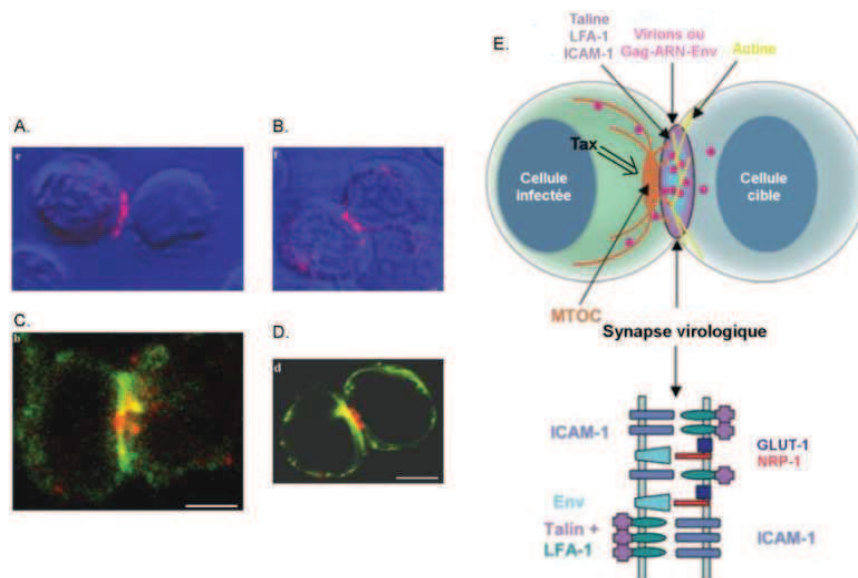


FIGURE 26 : LA SYNAPSE VIROLOGIQUE INDUITE PAR LE VIRUS HTLV-1

A. à D. Observation de la polarisation de différents composés viraux et cellulaires au niveau des contacts cellulaires suite à la formation de conjugués entre deux L_T CD4+. Les composants viraux (A) Gag en rouge et (B) Env en rouge sont polarisés au contact cellule-cellule. De même, des composants cellulaires tels que (C) la taline en vert, qui est concentrée au niveau des contacts cellulaires mais souvent de façon périphérique par rapport aux amas de Gag en rouge, ainsi que (D) le MTOC (tubuline α en vert et Gag en rouge) sont également repolarisés lors de la formation de contacts cellulaires induits par le virus HTLV-1. D'après (Igakura et al., 2003).

E. Schéma de la synapse virologique entre une cellule infectée et une cellule cible. Les contacts cellulaires, et notamment l'engagement des molécules d'adhérence ICAM-1 ainsi que la présence de Tax dans les cellules, induit la repolarisation du MTOC au niveau du contact cellule-cellule. D'autres molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire, LFA-1 et Taline, ont également été visualisées et impliquées dans la formation de cette synapse virologique. Outre le MTOC, les composants viraux, Gag, Env et génomes viraux sont également polarisés au niveau du contact cellule-cellule grâce au cytosquelette de microtubules. Des virions sont également produits au niveau de la synapse virologique. Par analogie avec ce qui a été montré pour la synapse virologique induite par le VIH, il semblerait que le cytosquelette d'actine permette, dans la cellule cible, le regroupement de molécules d'adhérence et des récepteurs de l'enveloppe virale au niveau de la synapse virologique. Adapté de (Piguet and Sattentau, 2004).

Le passage du virus suite à la formation de cette synapse virologique semble pouvoir emprunter plusieurs voies. Des virions enveloppés ont en effet été observés dans la fente synaptique grâce à la tomographie électronique, ces virions fusionnant parfois avec la cellule cible avant de s'être détachés de la cellule infectée (**Figure 27A**) (Majorovits et al., 2008). Cependant, l'observation de virus bourgeonnant en périphérie extérieure de la synapse virologique, notamment dans des lignées cellulaires chroniquement infectées, n'a jamais permis d'exclure le passage des virions par l'extérieur de cette synapse, profitant seulement de la proximité des cellules.

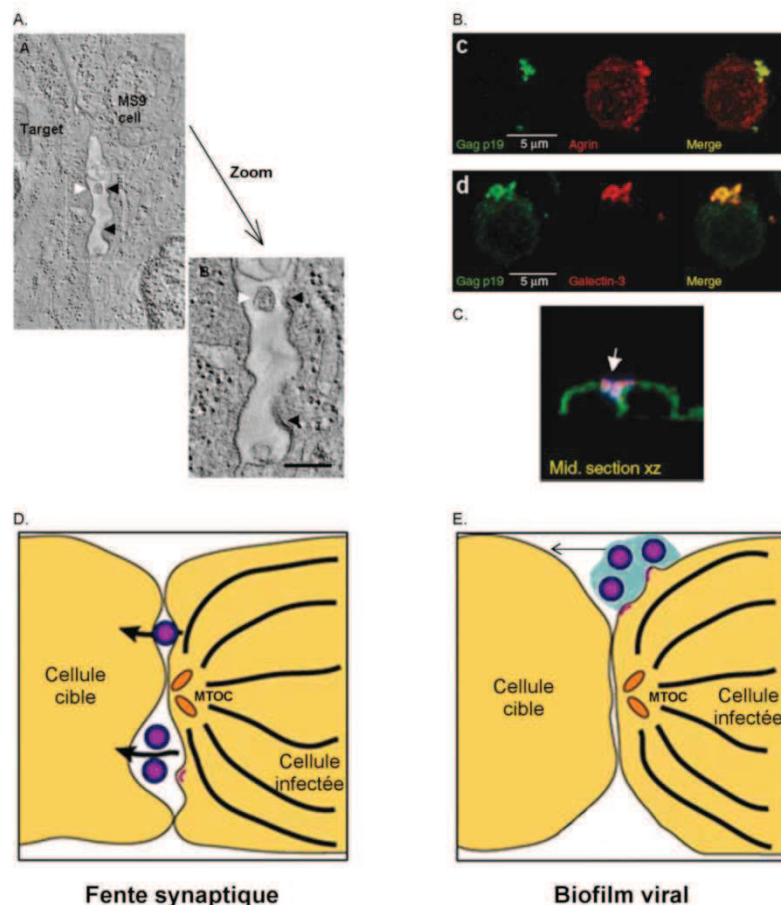


FIGURE 27 : DEUX MODELES DE TRANSMISSION DU VIRUS APRES FORMATION DE LA SYNAPSE

VIROLOGIQUE : A TRAVERS LA SYNAPSE VIROLOGIQUE ET VIA UN BIOFILM VIRAL

A. Observation en tomographie électronique de virions (flèches blanches) au niveau d'une fente synaptique. De chaque côté de la fente synaptique, les membranes plasmiques de la cellule infectée MS9 et de la cellule cible (target) sont très proches. Les flèches noires localisent les sites de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée, où s'accumulent les composants viraux. D'après (Majorovits et al., 2008).

B et C. Observation des biofilms viraux présents à la surface de L_T CD4+ infectés. (B) Des composants viraux et notamment Gag (vert) sont présents dans ces biofilms ainsi que des composants cellulaires, Agrine ou Galectine-3 (rouge) par exemple, qui forment une matrice riche en carbohydrates autour des virions. (C) Lors de la formation d'une synapse virale, le biofilm est transmis à la cellule cible. La surface des cellules est marqué en vert grâce à la concanavalline A et les composants viraux apparaissent en bleu et rouge. D'après (Pais-Correia et al., 2010).

D et E. Modèles de la transmission du virus HTLV-1 après formation de la synapse virologique : par la fente synaptique (D) ou par le transfert d'un biofilm viral (E). Adapté de (Majorovits et al., 2008).

Très récemment, Pais-Correia *et al.* ont démontré qu'effectivement les virions pouvaient être transmis à une cellule non infectée par cette voie. Cependant, dans ce cas, les virus sont concentrés et stockés dans une matrice riche en carbohydrates à la surface de la cellule infectée (**Figure 27B et C**) (Pais-Correia et al., 2010). La production des composants de cette matrice extracellulaire, notamment collagène et agrine (un HSPG), est induite par le virus. Ces amas de virus sont maintenus à la surface de la cellule infectée grâce à des protéines telles que la galectine-3 et la tétherine. Il est à noter ici le détournement par le

virus HTLV-1 d'une protéine qui a un rôle antiviral lors de l'infection par d'autres virus, et notamment le VIH, en empêchant leur libération. Lors d'un contact d'une cellule infectée avec une autre cellule, cet amas viral est rapidement transféré à la nouvelle cellule cible et une infection de cette cellule s'ensuit. Par analogie avec les organisations complexes formées par les bactéries, ces structures sont appelées biofilm viral. Que les virions soient transmis à travers la fente synaptique ou par l'extérieur de la synapse par le biais d'un biofilm viral, la transmission du virus HTLV-1 nécessite toujours la formation de la synapse virale et utilise des stratégies de propagation efficaces permettant la concentration d'un grand nombre de particules virales dans un petit espace, palliant ainsi le manque d'infectivité des particules virales (**Figure 27D et E**).

De plus, qu'il reste caché dans les fentes synaptiques ou à l'abri dans une matrice extracellulaire, le virus HTLV-1 utilise la mobilité naturelle des cellules immunitaires pour trouver de nouvelles cellules cibles sans être reconnu par le système immunitaire.

Deux autres modes de transmission du virus HTLV-1 ont également été décrits. Les cellules infectées peuvent induire la formation de syncytia et le taux de formation de ces syncytia semble corrélé à l'efficacité de transmission du virus HTLV-1, suggérant que leur formation pourrait être importante pour la transmission du virus (Taylor et al., 2009).

D'autre part, la protéine p8, en plus d'augmenter les contacts cellulaires, augmente aussi le nombre et la longueur des conduits cellulaires. Or le transfert de Gag et de la protéine p8 elle-même a été observé à travers ces conduits entre une cellule infectée et une cellule non infectée (Van Prooyen et al., 2010). Grâce à la protéine p8, le virus HTLV-1 pourrait se propager à travers des conduits cellulaires au sein d'un réseau de L_T , toujours caché du système immunitaire.

La transmission cellule-cellule impliquant la formation d'une synapse virologique a également été mise en évidence dans les cas d'infection par d'autres virus, notamment le VIH. Cependant, le virus HTLV-1 a une stratégie encore plus efficace pour ne pas être vu du système immunitaire en dehors des cellules infectées : la multiplication clonale.

c) La multiplication clonale : ne plus mettre le nez dehors

Comme cela a déjà été expliqué, le virus HTLV-1 possède une variabilité génétique très faible comparé aux autres virus à génome ARN (**Figure 5**). Pour expliquer cette faible

variabilité génétique, 3 hypothèses peuvent être émises : (i) le virus HTLV-1 ne se multiplie pas rapidement et ne fait que quelques cycles viraux par an, (ii) il possède une transcriptase inverse beaucoup plus fidèle que les autres rétrovirus, (iii) il se multiplie essentiellement sous forme provirale grâce à la mitose cellulaire. La première hypothèse n'est pas conciliable avec la forte charge provirale mesurée chez certains patients, allant parfois jusqu'à 10 copies de génome proviral pour 100 PBMC, suggérant une forte multiplication du virus (Shinzato et al., 1991). Concernant la deuxième hypothèse, le taux de mutations dû à la transcriptase inverse a été mesuré grâce à un système permettant un cycle unique de multiplication du virus HTLV-1. Ce taux de mutations est de l'ordre de 7.10^{-6} par paire de base et par cycle de multiplication (Mansky, 2000). Ce taux est comparable à celui mesuré pour le virus BLV et, comme pouvait le laisser présager les structures comparables des transcriptases inverses sans activité 3' exonucléase, seulement environ 4 fois plus faible que celui du VIH. Cette fidélité légèrement plus élevée de la transcriptase inverse ne peut pas expliquer à elle seule la différence de variabilité entre le VIH et le HTLV-1. Reste la troisième hypothèse. Une étude menée chez deux patients et visant à déterminer les sites d'intégration de plus de 100 clones cellulaires de chaque patient a clairement démontré la multiplication clonale du virus HTLV-1, non pas comme stratégie occasionnelle de multiplication mais comme la stratégie préférentielle utilisée par le virus (Wattel et al., 1995). Notamment, chez un patient, 94 clones cellulaires ne constituent en fait que 9 clones différents et seuls 6 clones cellulaires étaient uniques, démontrant l'oligoclonalité. Le nombre de clones uniques est beaucoup plus important chez une personne infectée depuis peu de temps que chez une personne infectée depuis longtemps (Tanaka et al., 2005).

Ainsi le modèle actuel est le suivant : suite à l'infection primaire, le virus HTLV-1 se multiplie brièvement par production de nouveaux virions et transmission à de nouvelles cellules cibles par le biais de la synapse virologique, donnant lieu à une infection polyclonale de L_T . Plus tard, le virus se multipliera essentiellement grâce à la mitose cellulaire, évitant ainsi tout risque de rencontre avec la réponse immunitaire qui s'est mise en place. Lors de la multiplication clonale, le génome viral est répliqué en même temps que le génome cellulaire par l'ADN polymérase cellulaire qui, contrairement à la transcriptase inverse, possède un mécanisme de correction sur épreuve. Ceci explique la grande stabilité du génome HTLV-1.

d) Faire le mort, une stratégie efficace : la répression de l'expression virale

Même si le virus ne produit pas ou peu de virions *in vivo* et qu'ils restent protégés du système immunitaire, l'expression du génome viral dans les cellules conduit à la reconnaissance des antigènes viraux, présentés à la surface des cellules infectées par le CMH-I. Même si p12 réduit l'expression du CMH-I à la surface, l'échappement des cellules infectées au système immunitaire n'est pas total. Le virus HTLV-1 a donc une dernière stratégie plus drastique : la répression de l'expression virale dans les cellules. La protéine Tax étant l'antigène viral le plus ciblé par la réponse immunitaire, la répression cible essentiellement l'expression de Tax mais Tax étant également le transactivateur principal du LTR viral, cela va conduire à une répression presque totale de l'expression du génome.

Plusieurs protéines virales ont la capacité d'inhiber l'expression virale, cette redondance démontrant le caractère essentiel de ce processus pour la persistance du virus dans l'organisme. La protéine auxiliaire p30 peut réprimer l'expression virale par deux mécanismes. Le premier, déjà présenté, repose sur le blocage de l'export nucléaire des ARNm *tax/rex*. En empêchant la traduction de Tax, p30 bloque l'expression de tout le génome viral. Il a aussi été montré que l'interaction de p30 avec Rex pouvait induire la séquestration de Rex dans le nucléole, l'empêchant de remplir son rôle dans l'export des ARNm viraux (Baydoun et al., 2007). Le deuxième effet de p30 mis en évidence repose sur la compétition de p30 et Tax pour l'interaction avec CBP/p300 : p30, en interagissant elle-même avec CBP/p300, interfère avec la formation des complexes quaternaires CREB-Tax-CBP/p300 sur les TRE au niveau du LTR viral et réprime ainsi l'expression virale (Zhang et al., 2001). De façon intéressante, il avait été précédemment montré que p30 avait un effet inhibiteur à forte dose sur la transcription à partir du LTR, résultat cohérent avec un effet de compétition, mais pouvait au contraire activer cette transcription lorsque p30 était présente en faible quantité dans la cellule (Zhang et al., 2000).

L'inhibition de la réplication de HTLV-1 est également une nouvelle fonction récemment identifiée de la protéine auxiliaire p13. P13 interagit directement avec la protéine Tax et diminue l'interaction de Tax avec les co-activateurs p300/CBP inhibant ainsi l'expression du génome viral. De plus, Tax stabilise la protéine p13 en induisant son ubiquitinylation et son recrutement dans les corps nucléaires suggérant un mécanisme complexe de contrôle de l'expression virale (Andresen et al., 2011).

La protéine HBZ est également un répresseur de l'expression virale. Tout d'abord, HBZ induit l'expression de PDLIM2, une E3 ubiquitine ligase, qui est capable d'envoyer Tax à la dégradation par le protéasome (Yan et al., 2009a; Zhao et al., 2009). HBZ interagit aussi avec les facteurs de transcription recrutés par Tax sur le promoteur viral, notamment CREB-2 et CBP/p300, et empêche de ce fait la formation du complexe quaternaire activateur sur les éléments de réponse TRE (Clerc et al., 2008; Gaudray et al., 2002). Alors que la transcription de HBZ est également dépendante de Tax et des TRE présents dans le LTR 3', il semble que HBZ peut activer sa propre transcription en s'associant au facteur de transcription JunD. Cette association a déjà été démontrée dans le cadre de l'activation du gène de la télomérase avec une fixation sur des sites Sp1 dans le promoteur (Kuhlmann et al., 2007; Thebault et al., 2004). Or des sites Sp1 ont justement été identifiés dans le promoteur d'HBZ et leur importance pour l'expression d'HBZ a été démontrée (Yoshida et al., 2008). Ainsi, alors que Rex et p30 sont capables de réprimer l'expression virale, notamment en interférant avec la fonction du transactivateur viral Tax, ils sont aussi dépendants de cette transcription virale pour leur propre synthèse. Au contraire, il semblerait qu'HBZ soit en partie indépendant de Tax pour sa transcription, permettant ainsi une répression du génome viral sur le long terme.

Il existe une convergence des mécanismes pour inhiber l'expression du génome viral dans les cellules infectées. Le virus peut donc persister dans l'organisme caché du système immunitaire tout en se propageant par multiplication clonale. Environ 95% des personnes infectées par le virus HTLV-1 resteront asymptomatiques toute leur vie bien que le virus soit toujours présent dans leur organisme. Parfois cependant, cet équilibre précaire entre persistance du virus et système immunitaire est rompu donnant lieu à des maladies chez les personnes infectées. De façon schématique, une prolifération des cellules infectées sans contrôle du système immunitaire aboutit à la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) alors qu'au contraire, une réaction inflammatoire trop importante aboutit au développement d'une myélopathie associée à HTLV-1 ou paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP, *HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis*) (pour revue (Gessain and Mahieux, 2012)). Les mécanismes sous-jacents à ce déséquilibre et à l'origine du développement de ces maladies chez seulement un petit nombre de personnes infectées sont en fait complexes et pas encore complètement élucidés.

E. PATHOLOGIES ASSOCIEES A HTLV-1 : LE DESEQUILIBRE DES FORCES EN PRESENCE

1. LEUCEMIE A CELLULES T DE L'ADULTE (ATL)

Très tôt, l'observation d'une concordance géographique entre les régions d'endémie pour le virus HTLV-1 et les régions d'endémie pour l'ATL a permis d'établir un lien de cause à effet entre le virus et la maladie (Blayney et al., 1983). De même, au niveau individuel, les malades souffrant d'ATL étaient tous séropositifs pour le virus HTLV-1 contrairement à la majorité des personnes non malades de la même région (Hinuma et al., 1982). La confirmation définitive a été apportée par la détection du provirus HTLV-1 intégré dans les cellules leucémiques de tous les patients ATL (Yoshida et al., 1984).

	Indolente	Chronique	Lymphome	Aiguë
Proportion de cas	5%	20%	20%	55%
Médiane de survie		24 mois	10 mois	6 mois
Survie à 4 ans	66%	27%	6%	5%
Symptômes				
% LT matures anormaux dans le sang périphérique	>5%	>5%	<1%	>5%
Lymphocytose absolue (> 4.10 ⁹ lymphocytes/L)	Non	Oui avec lymphocytose T (>3,5.10 ⁹ /L)	Non	Oui
Hypercalcémie ([Ca ²⁺]>2,74mmol/L)	Non	Non	Fréquente	Fréquente
Valeur de la lactate déshydrogénase (LDH) par rapport à la normale (limite haute)	Jusqu'à 1,5 fois	Jusqu'à 2 fois		
Lymphadénopathie	Non	Possible	Oui	Oui
Atteinte hépatique	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
Atteinte de la rate	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
Atteinte du système nerveux central	Non	Non	Possible	Possible
Atteinte des os	Non	Non	Possible	Possible
Atteinte du tractus gastro-intestinal	Non	Non	Possible	Possible
Effusion pleurale	Non	Non	Possible	Possible
Lésions pulmonaires	Possibles	Possibles	Possibles	Possibles
Lésions cutanées	Possibles	Possibles	Fréquentes	Fréquentes

TABEAU 3 : COMPARAISON DES 4 FORMES CLINIQUES D'ATLL

Les formes les plus agressives, aiguë et lymphome sont accompagnées de nombreux symptômes et associées à un mauvais pronostic. Les formes chronique et indolente sont moins faciles à détecter mais également mortelles même si la survie est un peu plus longue. Adapté de (Shimoyama, 1991; Verdonck et al., 2007).

a) Une lymphoprolifération maligne

L'ATL est une lymphoprolifération maligne agressive qui se déclare essentiellement chez l'adulte en moyenne 40 à 60 ans après l'infection initiale. Moins de 5% des personnes

infectées développeront une ATL et essentiellement après une contamination par l'allaitement dans l'enfance. Les hommes sont plus sujets au développement de la maladie que les femmes (ratio homme/femme = 1,4) (Gessain and Mahieux, 2012)

Il existe en fait plusieurs formes cliniques d'ATL qui ont été classifiées par Shimomaya en se basant sur les différents symptômes présentés par les patients (**Tableau 3**) (Shimoyama, 1991). Les formes aiguës et lymphomateuse sont les plus agressives et sont souvent associées à une hépato-splénomégalie, une hypercalcémie et des lésions cutanées, engageant un mauvais pronostic vital. La médiane de survie après le diagnostic n'est que de 6 mois pour les formes leucémiques (Yamaguchi and Watanabe, 2002). Ces symptômes peuvent aussi être accompagnés de l'atteinte de nombreux autres organes : manifestations neurologiques ou atteintes du tractus gastro-intestinal, osseuses souvent liées à l'hypercalcémie, et pulmonaires. Alors que les cellules leucémiques anormales sont nombreuses et facilement identifiables dans le sang périphérique des patients souffrant de la forme leucémique aiguë, la forme lymphomateuse se caractérise par un envahissement des organes lymphoïdes par ces cellules transformées et donc une lymphadénopathie importante. Pour inclure cette forme dans la dénomination de la maladie, on utilise aujourd'hui le terme ATLL pour *Adult T-cell Leukemia Lymphoma*. La forme chronique évolue plus lentement et présente un meilleur pronostic avec une médiane de survie à 24 mois. Comme pour la forme aiguë, il y a une hyperlymphocytose mais un nombre d'organes touchés beaucoup plus restreint : seules une hépato-splénomégalie, une hypercalcémie et des lésions cutanées sont observées. Enfin, dans la forme indolente, bien que des cellules anormales soient présentes dans le sang périphérique, aucune hyperlymphocytose n'est observée, contrairement aux autres formes leucémiques, mais les lésions cutanées sont fréquentes. Les patients souffrant des deux dernières formes peuvent évoluer vers une forme aiguë (Gessain, 2011). Il a récemment été proposé de distinguer une cinquième forme d'ATLL, la tumeur primaire cutanée, caractérisée comme son nom l'indique par des tumeurs cutanées sans aucun autre symptôme caractéristique des autres formes (Bittencourt et al., 2007). Il est à noter que les patient souffrant d'ATLL sont le plus souvent immunodéprimés et donc sensibles aux infections opportunistes et notamment à *Pneumocystis jirovecii* ou *Strongyloides stercoralis* (Verdonck et al., 2007).

Au niveau cellulaire, les cellules leucémiques sont très caractéristiques. En effet, ces cellules T qui portent de nombreux marqueurs d'activation ont une morphologie particulière

en forme de fleur. Elles présentent en effet un noyau convolué, de la chromatine condensée, des nucléoles petits ou absents et un cytoplasme basophile (**Figure 28**). L'observation de ces cellules est un indice important pour le diagnostic de l'ATLL, de même que la détection d'anticorps anti-HTLV-1 chez les patients. Cependant, le diagnostic définitif de l'ATLL n'est obtenu qu'après démonstration de l'intégration clonale d'HTLV-1 dans les cellules leucémiques.

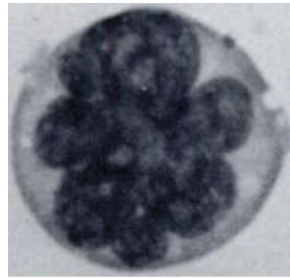


FIGURE 28 : CELLULE « EN FLEUR » CARACTERISTIQUE DE L'ATLL

De nombreuses cellules transformées chez les patients souffrant d'ATLL présentent une morphologie caractéristique en fleur avec un noyau très convolué, de la chromatine condensée et des nucléoles petits ou absents. Ces cellules ont été observées dès la première description de l'ATL en 1977. D'après (Uchiyama et al., 1977).

b) Les propriétés oncogéniques du virus HTLV-1 : implication de Tax mais pas seulement

Les mécanismes à l'origine de la transformation des cellules et du développement de l'ATLL ne sont pas complètement élucidés mais de nombreuses recherches ont permis de fortement améliorer leur compréhension.

Les propriétés oncogéniques du virus HTLV-1 ont été associées depuis longtemps à la Tax, une oncoprotéine unique par rapport aux autres rétrovirus car ne possédant pas d'homologue dans le génome cellulaire (pour revue (Chlichlia and Khazaie, 2010)). *In vitro*, la transfection de Tax dans des fibroblastes de rongeurs suffit à induire leur transformation et le développement de tumeurs après injection de ces cellules dans des souris *nude* (Tanaka et al., 1990). De même, Tax immortalise des L_T primaires humains *in vitro* (Grassmann et al., 1992). *In vivo*, des souris transgéniques exprimant Tax dans le compartiment lymphocytaire grâce au promoteur de Granzyme B développent une leucémie, démontrant là-encore les propriétés oncogéniques de Tax (Grossman et al., 1995). Ces propriétés oncogéniques de la protéine Tax reposent sur sa capacité à interférer avec de nombreux processus cellulaires (cycle cellulaire, apoptose, voies de signalisation, réparation de l'ADN...) qui seront exposés dans le prochain chapitre (pour revue (Matsuoka and Jeang, 2011)).

Cependant, aujourd'hui, de plus en plus d'arguments s'accumulent en faveur d'une implication importante des autres protéines virales dans le développement de l'ATLL. Le premier argument est que les ARNm codant la protéine Tax ne sont détectés que dans environ 35% des cas d'ATLL (Franchini et al., 1984; Takeda et al., 2004). En effet, la protéine Tax étant le principal antigène cible du système immunitaire, son expression est fortement réprimée. Outre les mécanismes de répression par les protéines virales p30 et HBZ, de nombreuses mutations et modifications épigénétiques du génome viral ont été identifiées dans les cellules ATLL. La séquence de *tax* elle-même est la cible de mutations, non-sens, insertion ou délétion, identifiées dans 10% des cas d'ATLL (Furukawa et al., 2001). Ces mutations pourraient être dues à un effet de APOBEC3G lors de la transcription inverse. Dans 15% des cas d'ATLL, le LTR 5' est la cible d'une méthylation importante des îlots CpG, empêchant toute transcription à partir de ce promoteur. Une méthylation partielle du promoteur est également présente dans 50% des cas alors qu'au contraire, le LTR 3' a tendance à être hypométhylé (Koiwa et al., 2002; Takeda et al., 2004). Enfin, tout ou partie du LTR 5' peut être délété, dans 27% des cas, empêchant son fonctionnement de façon définitive (Miyazaki et al., 2007; Tamiya et al., 1996). De plus, l'immortalisation des PBMC par la protéine Tax est un événement rare suggérant une implication d'autres protéines virales dans la transformation et le développement de l'ATLL (Bellon et al., 2010).

De nombreux arguments sont en faveur d'un rôle de HBZ dans la persistance des cellules ATLL. Tout d'abord, contrairement à la protéine Tax, la protéine HBZ est présente de façon constante dans toutes les cellules ATLL (Satou et al., 2006). L'expression d'HBZ ne semble pas faire courir de risques à la cellule ATLL puisque les LT_C dirigés contre la protéine HBZ ne semblent pas pouvoir lyser les cellules ATLL (Suemori et al., 2009). De plus, la déplétion de l'expression d'HBZ dans les cellules ATLL inhibe leur prolifération. Cette stimulation de la prolifération des cellules est une propriété de l'ARNm et non de la protéine (Satou et al., 2006). De plus, la protéine HBZ est également capable d'activer l'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires, dont le gène codant la sous-unité catalytique de la télomérase, important pour la prolifération cellulaire (Kuhlmann et al., 2007).

Aujourd'hui, un modèle du développement de l'ATLL est donc apparu. Suite à la primo-infection, essentiellement par l'allaitement, une infection polyclonale se développe dans l'organisme grâce à quelques cycles de multiplication viraux. Puis rapidement, et sous l'impulsion de la protéine Tax qui stimule la prolifération cellulaire et l'immortalisation des

cellules, une phase de multiplication clonale se met en place. La multiplication des cellules sans contrôle des éventuelles altérations génétiques va conduire à l'acquisition de nouvelles mutations et finalement du phénotype transformé. La protéine Tax étant très immunogène, il est probable qu'une sélection des clones n'exprimant pas la protéine Tax s'établit ensuite sous la pression du système immunitaire. Ainsi, après l'immortalisation des cellules par la protéine Tax, les cellules persistent et prolifèrent de façon indépendante de Tax. La protéine HBZ dont l'expression augmente quand l'expression de Tax diminue joue alors probablement un rôle important dans cette deuxième phase. L'acquisition de nouvelles mutations dans le génome cellulaire pourraient également favoriser cette prolifération indépendamment de la présence de Tax (**Figure 29**). La dérégulation de l'expression des miARN notamment pourrait jouer un rôle (pour revue (Bouzar and Willems, 2008; Jeang, 2010b)).

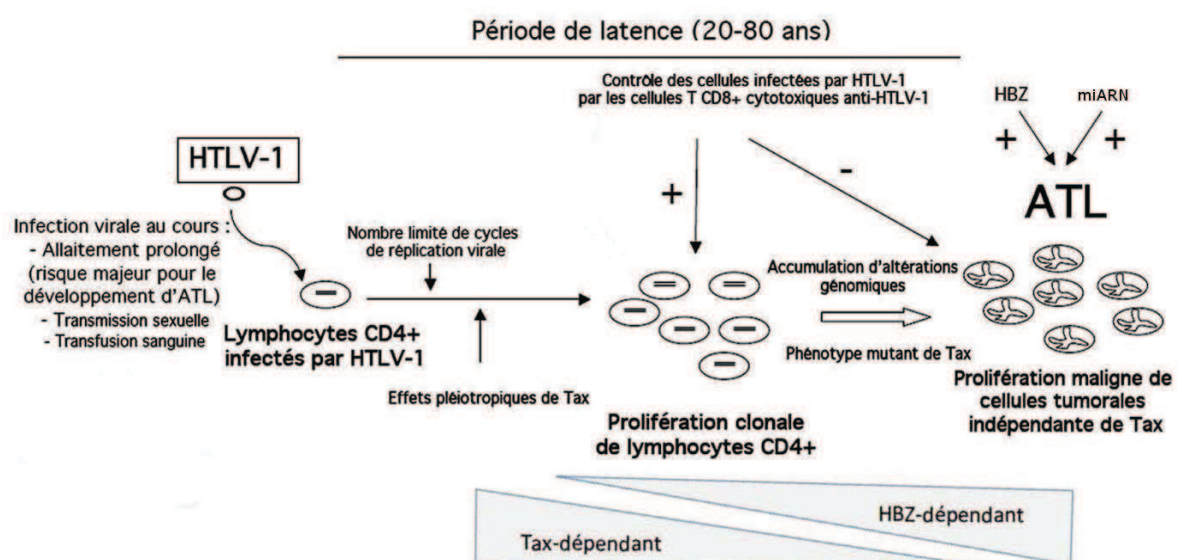


FIGURE 29 : MODELE DE DEVELOPPEMENT D'UNE ATLL.

Après l'infection des lymphocytes par le virus HTLV-1, essentiellement après allaitement, et une multiplication infectieuse limitée, une première phase dépendante de Tax va induire l'immortalisation des cellules infectées et leur prolifération continue. Sous la pression du système immunitaire, les cellules ATLL vont exprimer moins de Tax au profit d'HBZ. Ainsi lors d'une deuxième phase, HBZ va assurer la prolifération et la persistance de ces cellules qui vont, au cours de leurs nombreuses multiplications, acquérir des mutations pouvant les conduire au statut de cellules transformées. Adapté de (Gessain, 2011).

Ce modèle est cohérent avec le fait que l'ATLL ne se déclare que chez moins de 5% des personnes infectées et après un temps de latence très long après la primo-infection. L'infection par le virus HTLV-1 n'est pas suffisante pour induire la maladie mais des événements supplémentaires sont nécessaires pour aboutir à la transformation des cellules.

Les protéines auxiliaires p12, p13 et p30, qui ne sont pas nécessaires à l'infection des cellules *in vitro*, sont au contraire requises pour la persistance et l'infectivité du virus *in vivo*. Entre autres, certaines de leurs fonctions favorisent la prolifération cellulaire et pourraient participer à la mise en place du phénotype transformé (pour revue (Edwards et al., 2011)).

c) ATLL et immunosuppression

Même si ce ne sont pas les cellules leucémiques qui expriment le marqueur FoxP3+, il reste évident qu'une fréquence anormalement élevée de cellules FoxP3+ sont présentes parmi les cellules CD4+ des patients souffrant d'ATLL (Kohno et al., 2005; Satou et al., 2012; Toulza et al., 2009). La production importante de la chimiokine CCL22 par les cellules infectées favoriserait la survie des cellules CCR4+, marqueur des Treg, comme cela a été montré *in vitro* (Hieshima et al., 2008; Toulza et al., 2010; Yoshie et al., 2002). Or les patients souffrant d'ATLL et présentant une forte expression de Foxp3 semblent plus susceptibles aux infections (Karube et al., 2008). Ainsi le taux anormalement élevé de Treg induite par le virus HTLV-1 pourraient expliquer l'immunosuppression observée chez de nombreux patients souffrant d'ATLL. Plus précisément, il a été montré que seules les cellules Tax- Foxp3+ CD4+ agissaient effectivement comme des Treg inhibant la réponse des LTC mais également la prolifération des cellules ATLL (Toulza et al., 2008; Toulza et al., 2009; Toulza et al., 2010). Ces cellules, particulièrement abondantes chez les patients souffrant d'ATLL chronique par rapport aux patients souffrant d'ATLL aiguë, retarderait donc la progression de la maladie, en plus d'induire un état d'immunosuppression chez les patients (Toulza et al., 2009).

D'autres mécanismes peuvent coopérer pour favoriser l'immunosuppression. Nous avons déjà décrit les différents effets inhibiteurs de Tax et plus largement du virus HTLV-1 sur la réponse immunitaire innée (cf II-D-2-a). D'autre part, le fratricide entre L_T CD8+ infectés et L_T CD8+ autologues diminue le nombre de L_T pouvant combattre les infections (Hanon et al., 2000b). Les défenses formées par les L_T CD8+ peuvent également être inhibées par la protéine p8 qui induit l'anergie des L_T (Fukumoto et al., 2007).

d) Modèles d'étude et traitements : encore beaucoup de travail.

Aujourd'hui les modèles d'étude pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de l'ATLL restent limités. Alors que les lapins ont permis de mieux

comprendre les voies de transmission du virus HTLV-1, ces animaux ne développent pas de maladie (Lairmore and Franchini, 2007). Le virus BLV, dont les propriétés virologiques et oncogéniques sont très proches du virus HTLV-1 est un bon modèle à suivre notamment en matière de prévention et traitement contre l'infection (Gillet et al., 2007; Lezin et al., 2009; Rodriguez et al., 2011). Alors que le virus BLV infecte naturellement les bovins, il est possible d'infecter expérimentalement les moutons. Cet hôte présente l'avantage d'une latence beaucoup plus courte entre l'infection et le développement de maladies qui sont d'ailleurs plus fréquentes que chez l'hôte naturel (Florins et al., 2007). Les primates non-humains peuvent également servir de modèle d'étude. Les infections naturelles par le virus HTLV-1 peuvent en effet parfois déboucher sur le développement de leucémies et de lymphomes. Cependant, il est nécessaire d'étudier les mécanismes propres du virus HTLV-1 et de trouver des traitements efficaces pour ce virus. Des singes écureuils ont été infectés efficacement par le virus HTLV-1 et ont permis le test de vaccins anti-HTLV-1 (Kazanji, 2000; Kazanji et al., 2001). Cependant, les souris restent les animaux les plus faciles à manipuler et de nombreuses souris transgéniques ont permis de mieux comprendre le rôle des protéines virales, et notamment de Tax, individuellement. L'expression de Tax restreinte aux thymocytes, grâce à l'utilisation du promoteur de la Ick, une tyrosine kinase, chez la souris va induire une maladie très proche de l'ATLL (Hasegawa et al., 2006). Mais le modèle le plus efficace pour obtenir des pathogénèses proches de celles induites par le virus HTLV-1, notamment l'ATLL, est aujourd'hui obtenu par la xénogreffe de cellules ATLL dans des souris. Même si l'évolution de la maladie n'est pas exactement la même que chez l'Homme, les caractéristiques communes avec l'ATLL sont nombreuses (Zimmerman et al., 2010).

Malgré des modèles animaux limités, un certain nombre de traitements ont pu être testés. Il est important de développer de nouveaux traitements car les polychimiothérapies utilisées classiquement pour traiter les leucémies sont inefficaces contre l'ATLL avec seulement une faible augmentation de la médiane de survie (Tsukasaki et al., 2009). L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été testée avec succès, réduisant très efficacement la charge provirale, qui peut même devenir indétectable chez certains patients (Okamura et al., 2005). Cela est dû à une réaction modérée du greffon contre l'hôte qui permet d'éliminer les cellules infectées (Kanda et al., 2012). Cependant, la mortalité liée à cette procédure très invasive reste élevée, de même que le risque de développement de maladies opportunistes. Ce traitement est donc efficace mais seulement dans des cas

restreints de patients jeunes avec une ATLL agressive (Tsukasaki et al., 2009). Cette procédure nécessite en plus de trouver un donneur compatible.

Un traitement en cours de test chez l'Homme semble très prometteur : l'IFN α + zidovudine (anciennement AZT). Plusieurs essais de phase II ont révélé que la combinaison de l'IFN α et de la zidovudine permettait de prolonger de façon significative la vie des patients souffrant des formes aiguë, chronique ou indolente de l'ATLL avec un bon taux de réponse au traitement et de rémissions complètes (pour revue (Nasr et al., 2011)). Dans le cas de la forme lymphomateuse cependant, le traitement n'est pas efficace. De plus, l'efficacité du traitement IFN α + zidovudine est conditionnée à son utilisation avant toute chimiothérapie. La chimiothérapie pourrait en effet sélectionner des clones où le suppresseur de tumeur p53 serait muté et sur lesquels l'IFN α et la zidovudine ne seraient pas efficaces (Nasr et al., 2011). Le mécanisme d'action des ces deux molécules n'est pas encore bien compris mais les effets antiviraux et antiprolifératifs de l'IFN α sont bien connus. La zidovudine est un inhibiteur de la transcriptase inverse, bien connu pour le VIH, mais dont l'efficacité anti-HTLV-1 a également été vérifiée. Dans un modèle de lapin, la zidovudine diminue très fortement la charge provirale (Isono et al., 1990). De plus, *in vitro*, la zidovudine inhibe la transmission du virus HTLV-1 entre PBMC (Macchi et al., 1997). Bien sûr, le modèle actuel est que le virus HTLV-1 ne se multiplie pas dans les cellules ATLL et il est donc difficile de comprendre comment l'IFN α et la zidovudine peuvent exercer leurs effets antiviraux. Cependant, l'existence dans l'organisme de réservoirs où le virus continue de se multiplier ne peut pas être exclue. En effet, l'impossibilité de cultiver les cellules ATLL *in vitro* ainsi que l'inefficacité de la combinaison IFN α + zidovudine *in vitro* sont des arguments en faveur d'un modèle dans lequel les cellules ATLL seraient dépendantes pour se multiplier de leur environnement *in vivo* et des communications avec des cellules où la multiplication de HTLV-1 serait encore active. L'IFN α et la zidovudine agiraient alors sur ces réservoirs viraux (Nasr et al., 2011).

Aujourd'hui, une troisième molécule est testée en combinaison avec l'IFN α et la zidovudine : l'arsenic. La combinaison de l'arsenic et de l'IFN α a déjà prouvé son efficacité dans le traitement de la leucémie promyélocytique aiguë (Nasr et al., 2008). De plus, IFN α + Arsenic sont capables d'induire l'apoptose des cellules ATLL en entraînant notamment la dégradation de la protéine Tax (El-Sabban et al., 2000). Cette observation suggère d'ailleurs

une importance de la présence de la protéine Tax pour la survie des cellules ATLL, contrairement au modèle actuel. Un essai de phase II avec ces 3 composés, Arsenic+IFN α +zidovudine a donné des résultats très prometteurs et des effets indésirables modérés (Kchour et al., 2009).

D'autres molécules pourraient également faire l'objet d'essais cliniques. Un inhibiteur du protéasome, le Bortezomib, est capable de limiter la prolifération de cellules tumorales Tax positives et de sensibiliser ces cellules à l'apoptose (Mitra-Kaushik et al., 2004; Nasr et al., 2005; Satou et al., 2004). De même, les inhibiteurs de la voie NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) sensibilisent les cellules ATLL à l'apoptose (Mori et al., 2002). Les anticorps monoclonaux anti-CD25 et anti-CCR4 se révèlent également efficaces sur les cellules ATLL dans des modèles animaux (Ishii et al., 2010; Phillips et al., 2000).

2. PARAPARESIE SPASTIQUE TROPICALE / MYELOPATHIE ASSOCIEE A HTLV-1 (TSP/HAM)

L'association de nombreux cas de paraparésie spastique tropicale en Martinique avec l'infection par le virus HTLV-1 a été faite pour la première fois en 1985 (Gessain et al., 1985). Cette association a été rapidement suivie par l'association d'une autre myélopathie chronique avec l'infection par le virus HTLV-1 au Japon (Osame et al., 1986). Cette maladie appelée myélopathie associée à HTLV-1 et la TSP décrite par Gessain *et al.* se sont ensuite révélées être la même maladie désormais appelée TSP/HAM (Roman and Osame, 1988). Contrairement à l'ATLL où le système immunitaire est affaibli, la TSP/HAM est une maladie inflammatoire chronique associée à une démyélinisation et une dégénération axonale de la substance blanche et grise de la moelle épinière.

a) Une myélopathie chronique

Tout comme l'ATLL, la TSP/HAM est une maladie de l'adulte, les premiers signes apparaissant généralement vers 40 ou 50 ans, même si de rares cas ont été signalés chez des enfants (Kendall et al., 2009; Orland et al., 2003). La latence entre l'infection par le virus HTLV-1 et l'apparition des premiers signes de la maladie peut durer des dizaines d'années, comme dans le cas de l'ATLL, mais peut aussi être beaucoup plus courte, ne durant que quelques années. Par contre, l'apparition de la TSP/HAM est rare, tout comme pour l'ATLL,

car elle ne concerne que 0,25 à 3% des personnes infectées. Alors que l'ATLL est fortement associée à une transmission du virus par l'allaitement, la TSP/HAM est surtout associée à une contamination par transfusion sanguine ou relations sexuelles (Gessain and Mahieux, 2012). Une autre différence épidémiologique par rapport à l'ATLL est que la TSP/HAM touche plus de femmes que d'hommes avec un ratio homme/femme de l'ordre de 0,4 (Gessain and Mahieux, 2012).

Comme dans le cas de l'ATLL, de nombreux symptômes peuvent être présents chez les patients et il est parfois difficile de différencier la TSP/HAM d'autres myélopathies pouvant lui ressembler. L'Organisation Mondiale de la Santé a donc établi une liste de critères diagnostiques permettant d'identifier la TSP/HAM chez les patients. Parmi les critères cliniques, la manifestation principale est une paraparésie spastique qui progresse lentement. Les troubles urinaires sont souvent parmi les premiers signes de la maladie. D'autres symptômes sont classiquement associés : des douleurs lombaires qui peuvent irradier dans les jambes, une faiblesse musculaire surtout au niveau des membres inférieurs, une hyperréflexie des membres supérieurs ou inférieurs notamment. D'autres signes peuvent être présents de façon moins fréquente, notamment des atteintes du système nerveux périphérique. Mais le diagnostic est le plus souvent établi grâce aux signes biologiques : pléïocytose à dominante lymphocytaire modérée dans le liquide céphalorachidien avec parfois observation de quelques cellules en fleur typiques de l'ATLL dans le sang ou le liquide céphalorachidien, possible augmentation des protéines dans le liquide céphalorachidien mais surtout détection d'anticorps anti-HTLV-1 dans le sang et le liquide céphalorachidien et isolation du virus HTLV-1 chez le patient (De Castro-Costa et al., 2006).

Les symptômes cliniques sont associés au niveau cellulaire à des infiltrations inflammatoires de cellules mononucléaires au niveau de la moelle épinière thoracique essentiellement. Cette zone correspondrait à une région où le flux sanguin est le plus faible (Izumo, 2010). Ces cellules infiltrées sont le plus souvent des L_T CD4⁺ et CD8⁺ au début de la maladie et des L_T CD8⁺ en majorité après un certain temps d'évolution de la maladie (Umehara et al., 1993). Ces lésions inflammatoires touchent surtout la substance blanche de la moelle épinière, avec une démyélinisation et une dégénération axonale, mais des infiltrats sont aussi observés dans la substance grise même si les cellules neuronales semblent préservées (Izumo, 2010).

b) HTLV-1 et une réponse immunitaire exacerbée

La TSP/HAM est une maladie inflammatoire et trouve donc son origine dans une dérégulation du système immunitaire. De plus, le lien avec l'infection par le virus HTLV-1 a été clairement établi. Cependant, les événements qui mènent de l'infection par le virus au développement de la maladie sont encore mal compris. Trois modèles sont aujourd'hui proposés pour expliquer l'inflammation observée dans le système nerveux central des patients (pour revue (Lepoutre et al., 2009; Miller et al., 2012)) (**Figure 30**). Le modèle cytotoxique repose sur l'infection des cellules gliales (Afonso et al., 2008; Lehky et al., 1995). Ces cellules gliales sont ensuite reconnues et lysées par les LTc dirigés contre les antigènes viraux. Le deuxième modèle repose sur un processus d'auto-immunité. Des anticorps ou LTc dirigés contre des antigènes viraux (Tax) peuvent reconnaître des protéines neuronales de l'hôte (hnRNP A1) (Levin et al., 2002). Enfin, dans le modèle « *bystander* », la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, dont le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\gamma$, par les lymphocytes infectés ou spécifiques des antigènes viraux qui se sont infiltrés, provoque l'altération des cellules du système nerveux central (Kuroda and Matsui, 1993; Nakamura et al., 1993). L'effet néfaste du $\text{TNF}\alpha$ sur la myéline a déjà été montré (Brosnan et al., 1988).

Dans tous les cas, le passage de la barrière hémato-encéphalique par le virus ou les cellules infectées est nécessaire (**Figure 30**). Ce passage a été confirmé par la détection de protéines Tax dans le liquide céphalorachidien (Cartier and Ramirez, 2005). De plus, le fait que les lymphocytes infectés dans le liquide céphalorachidien et dans le sang présentent les mêmes sites d'intégration des provirus démontre le passage de cellules infectées à travers la barrière hémato-encéphalique et non seulement du virus (Cavrois et al., 2000). Les recherches sur le passage de cette barrière ont montré que les lymphocytes infectés, par la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$, entre autres cytokines, pouvaient altérer la structure de la barrière hémato-encéphalique et notamment les jonctions serrées, augmentant ainsi la perméabilité paracellulaire (Afonso et al., 2007). L'infection des cellules endothéliales cérébrales altère également l'expression des protéines des jonctions serrées (Afonso et al., 2008). Les lymphocytes peuvent donc passer entre les cellules endothéliales. Mais le virus semble également pouvoir passer par transcytose à travers les cellules endothéliales (Afonso et al., 2007; Romero et al., 2000).

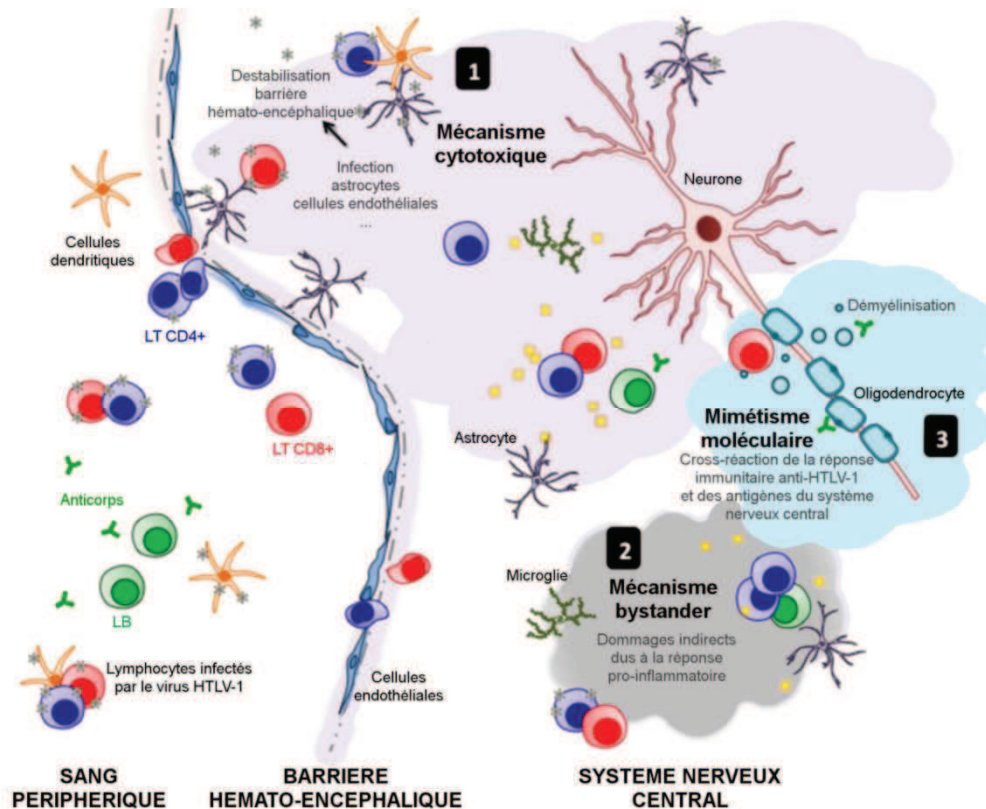


FIGURE 30 : MODELES DE L'EFFET NEFASTE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS HTLV-1 SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Suite à l'infection par le virus HTLV-1 et l'infiltration des lymphocytes infectés dans le système nerveux central en passant la barrière hémato-encéphalique, 3 modèles peuvent expliquer les lésions inflammatoires observées dans le système nerveux central : le modèle cytotoxique où le système immunitaire détruit directement les cellules du système nerveux infectées, le modèle bystander où la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires va affecter les cellules du système nerveux et enfin le modèle auto-immun dans lequel les cellules du système nerveux sont la cible du système immunitaire à cause d'un mimétisme moléculaire. Adapté de (Oliere et al., 2011).

Tout comme ce qui a été décrit pour l'ATLL, les lymphocytes CD4⁺ CD25⁺ CCR4⁺ sont toujours les cellules préférentiellement infectées par le virus HTLV-1 chez les patients souffrant de TSP/HAM (Yamano et al., 2009). Cependant, ces lymphocytes ont une faible expression de Foxp3, mais également de G_{ITR} (*Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*) et de CTLA-4, des protéines impliquées dans l'activité suppressive des Treg, chez les patients souffrant de TSP/HAM (Ramirez et al., 2010; Satou et al., 2012). Au contraire, ces cellules produisent de l'IFN γ ainsi que d'autres cytokines pro-inflammatoires normalement sécrétées par les lymphocytes Th1 (Yamano et al., 2009). Les cellules infectées par le virus HTLV-1 chez ces patients présentent donc un profil unique qui n'est que très rarement retrouvé chez les personnes saines. Ces cellules peuvent être appelées T_{HAM} (Araya et al., 2011). La production d'IFN γ par les cellules infectées pourrait donc favoriser l'inflammation après infiltration dans le système nerveux central. De plus, le nombre important des cellules T_{HAM} semble corrél

avec la sévérité de la maladie (Yamano et al., 2009). Au contraire, chez les personnes souffrant de TSP/HAM, les cellules Foxp3⁺ infectées par HTLV-1 n'exercent plus leur activité immunosuppressive (Toulza et al., 2008). L'ensemble de ces observations peut expliquer en partie la forte réponse immunitaire anti-HTLV-1, aussi bien anticorps que LTc, qui s'opère chez les patients TSP/HAM (Hayashi et al., 2008; Nakagawa et al., 1995). Ainsi, au contraire de ce qui se passe chez les patients ATLL immunodéprimés, où les cellules infectées Foxp3⁺ sont nombreuses, les patients TSP/HAM ont un déséquilibre, toujours en faveur des cellules infectées, mais qui cette fois produisent des cytokines inflammatoires (**Figure 31**).

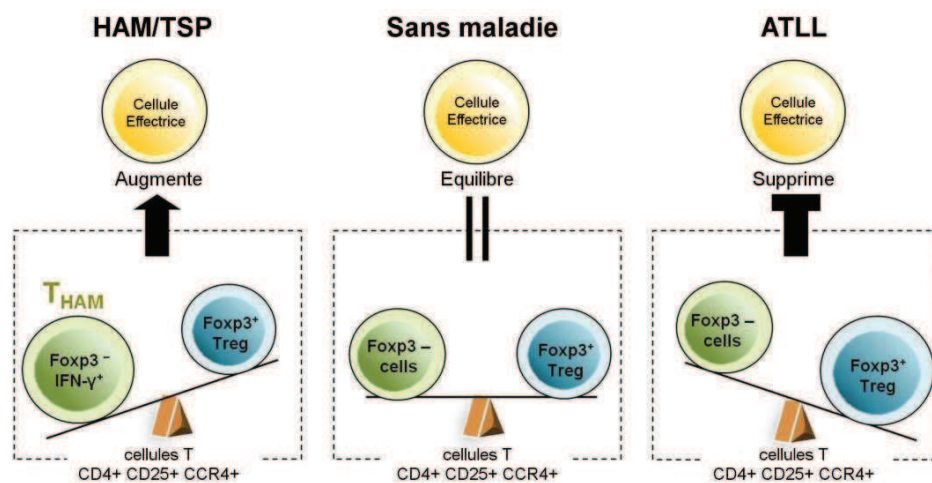


FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DESEQUILIBRES IMMUNITAIRES INDUIT PAR LE VIRUS HTLV-1

Chez les patients souffrant d'ATLL et de TSP/HAM, des déséquilibres contraires sont observés notamment entre cellules T régulatrices immunosuppressives Foxp3⁺ et les autres cellules T. Adapté de (Araya et al., 2011)

Comment les cellules Treg, suite à l'infection, peuvent devenir des cellules T_{HAM} est une question intéressante. Tax pourrait être à l'origine de cette diminution de l'expression de Foxp3. En effet, il a été montré que Tax réprimait l'expression de Foxp3 *in vitro* (Yamano et al., 2005) et l'expression de Foxp3 est inversement corrélée à celle de Tax dans les cellules des patients (Ramirez et al., 2010). Or l'expression de Tax est plus importante chez les patients TSP/HAM que chez les autres personnes infectées (Yamano et al., 2002). De plus, cette expression de Tax est corrélée à la charge provirale (Asquith et al., 2005). Une charge provirale élevée est un facteur de risque important pour le développement et la progression d'une TSP/HAM (Nagai et al., 1998). En effet, de nombreuses études ont démontré que les patients souffrant de TSP/HAM avaient des charges provirales 5 à 16 fois plus élevées que les personnes infectées asymptomatiques (Hashimoto et al., 1998; Kubota et al., 1993).

Récemment, Meekings et al. ont démontré que l'intégration du provirus dans les régions transcriptionnellement actives du génome cellulaire favorisait l'expression du provirus et le développement de TSP/HAM (Meekings et al., 2008). Ainsi, une intégration dans une région favorable va permettre l'expression des protéines virales et notamment Tax, qui va, d'un côté augmenter la charge provirale en stimulant la prolifération des cellules infectées et de l'autre côté induire une réponse immunitaire importante. L'expression de Tax serait en fait le réel facteur de risque de développer une TSP/HAM (Bangham et al., 2009). Un autre facteur de risque important pour le développement de TSP/HAM est le génotype HLA des patients qui détermine les épitopes fixés par le CMH et présentés au système immunitaire. Le génotype HLA-A*02 par exemple est corrélé à une faible charge provirale et semble donc plutôt protecteur alors qu'au contraire HLA-B*5401 augmente le risque de développement de la maladie (Jeffery et al., 2000; Jeffery et al., 1999).

De la même façon que pour le développement de l'ATLL, la **Figure 32** représente les principales étapes entre l'infection par le virus HTLV-1 et les lésions inflammatoires du système nerveux central ainsi que les principaux facteurs modulant cette évolution.

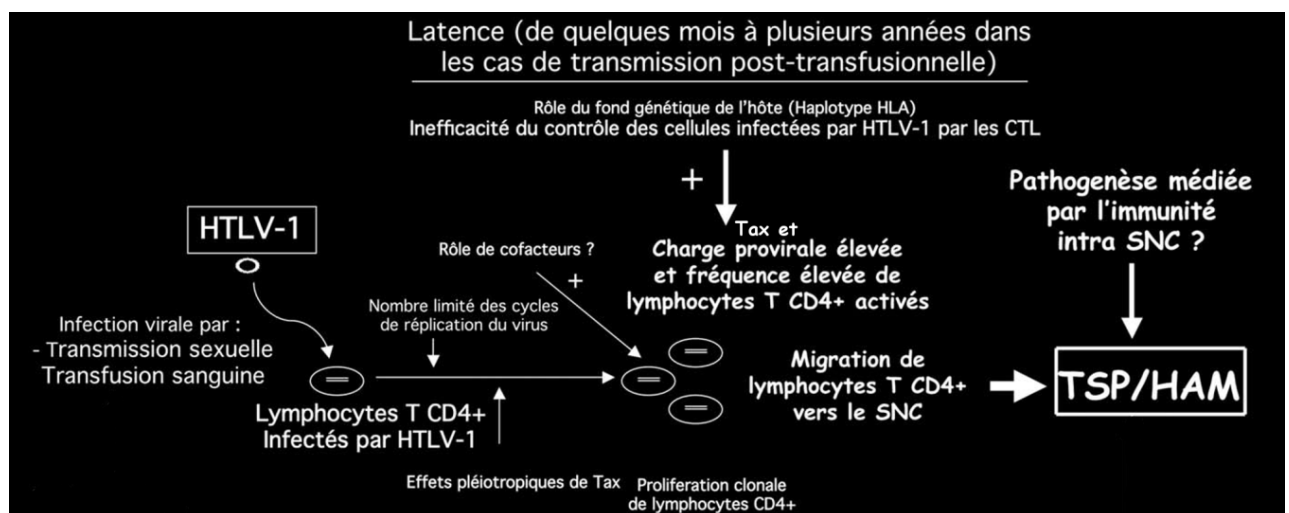


FIGURE 32 : MODELE DE DEVELOPPEMENT D'UNE TSP/HAM

Après l'infection des lymphocytes par le virus HTLV-1, essentiellement après transmission sexuelle ou transfusion sanguine, et une multiplication infectieuse limitée, une première phase dépendante de Tax va induire la prolifération des cellules infectées. Après migration dans le système nerveux central des cellules infectées vont induire des lésions inflammatoires. Adapté de (Gessain, 2011).

c) Modèles d'étude et traitements : toujours plus de travail.

Les modèles animaux mimant la TSP/HAM sont encore plus limités que ceux permettant l'étude de l'ATLL. Les rats sont principalement utilisés. En fait, une seule souche

de rats développe des lésions comparables à la TSP/HAM : les rats Wistar-King-Aptekman-Hokudai (WKAH) (Lairmore and Franchini, 2007). Le fait que la plupart des autres rats ne développe pas de lésions suggère une restriction génétique qui a depuis été identifiée comme étant l'exportine CRM1 impliquée dans l'export des ARNm viraux. Ceci a conduit au développement de modèles de rats transgéniques exprimant la protéine CRM1 humaine (Takayanagi et al., 2007).

Les traitements offerts aux patients sont également très limités. Aujourd'hui, le traitement des symptômes est la base des thérapies proposées. Des études ont été réalisées pour tester des molécules modulant la réponse immunitaire, notamment les corticostéroïdes. Cependant les résultats sont controversés. Quelques bénéfices ont été observés à court-terme mais seulement transitoirement et essentiellement chez des patients au début de leur maladie. Il est probable que l'absence d'amélioration nette soit due aux dommages irréversibles subis par le système nerveux central (Gessain and Mahieux, 2012). Une étude a également testé deux antirétroviraux, zidovudine et lamivudine, mais sans observer d'amélioration clinique ni de diminution de la charge virale en un an (Taylor et al., 2006). Aujourd'hui, une stratégie est à l'étude pour réactiver l'expression virale et ainsi permettre l'action des antirétroviraux. Le valproate, un inhibiteur d'histones déacétylases, a ainsi été testé avec cet objectif. Comme attendu, la charge provirale a augmenté dans les premiers temps du traitement mais a ensuite diminué très fortement. Probablement à cause des lésions déjà irrémédiables, aucune amélioration clinique ne fut associée à cette diminution de la charge provirale (Lezin et al., 2007). Une essai clinique sur une période de deux ans a permis de vérifier que, même s'il n'y a pas d'amélioration des symptômes ou de la charge provirale à long terme, le valproate n'engendre pas d'effets secondaires et préserve la réponse cytotoxique (Olindo et al., 2011). Il est ainsi possible d'envisager un traitement associant le valproate et un inhibiteur de la transcriptase inverse. Un premier test a montré que le traitement des singes infectés avec le virus STLV-1 avec du valproate et de la zidovudine induit une forte diminution de la charge provirale sans augmentation préalable de celle-ci (Afonso et al., 2010). Le valproate active l'expression virale, notamment de Tax et de Gag sur le long terme en bloquant l'expression de HBZ (Belrose et al., 2011) favorisant une réponse immunitaire efficace, alors que la zidovudine empêche l'infection de nouvelles cellules après la réactivation de l'expression virale par le valproate (Gessain and Mahieux, 2012).

3. PLUSIEURS AUTRES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU VIRUS HTLV-1

Outre l'ATLL et la TSP/HAM, dont l'association avec le virus HTLV-1 a été prouvée, d'autres maladies ont également été associées à l'infection par ce virus avec plus ou moins d'arguments. La force de l'association repose en effet sur des études épidémiologiques, des analyses virologiques et des modèles animaux (Proietti et al., 2005).

L'uvéïte est la troisième maladie dont l'association est aujourd'hui reconnue avec l'infection par le virus HTLV-1. Des études épidémiologiques et virologiques, menées essentiellement au Japon, ont montré la présence du virus et de nombreux lymphocytes infectés dans le liquide vitreux (Mochizuki et al., 1992; Ono et al., 1998). Au niveau clinique, l'uvéïte reste généralement bénigne et se résorbe en quelques semaines, mais des complications peuvent parfois survenir. Par contre, dans la très grande majorité des cas, la maladie est récurrente avec un intervalle moyen de 16 mois entre les épisodes. L'uvéïte associée à HTLV-1 peut être observée seule chez les personnes infectées ou associée à d'autres symptômes dans les cas de TSP/HAM (Nakao et al., 1999).

La dermatite infectieuse, qui reste rare et affecte essentiellement les enfants, ainsi que les myosites et polymyosites présentent également plusieurs arguments en faveur d'une association avec le virus HTLV-1. Pour d'autres maladies, telles que l'arthrite ou le syndrome de Sjögren, d'autres études sont nécessaires pour attester de l'association avec HTLV-1 (pour revue (Goncalves et al., 2010; Proietti et al., 2005; Verdonck et al., 2007)).

4. HTLV-2 : UN POUVOIR PATHOGENE BEAUCOUP PLUS FAIBLE

Bien que HTLV-2 ait au départ été isolé chez un patient souffrant de leucémie T à tricholeucocytes, ce virus n'a depuis été associé à aucune maladie lymphoproliférative (Feuer and Green, 2005). Pourtant, HTLV-2 possède des propriétés transformantes *in vitro* mais avec un tropisme préférentiel L_T CD8⁺ et non CD4⁺ comme HTLV-1 (cf partie II-C-1-a). Par contre, HTLV-2 a été retrouvé dans de rares cas de myélopathies qui ressemblent à la TSP/HAM (Dooneief et al., 1996; Hjelle et al., 1992; Murphy et al., 1997). Ainsi, bien que très proche du virus HTLV-1, HTLV-2 est beaucoup moins pathogène que HTLV-1 et peut servir de point de comparaison pour élucider les différences qui pourraient être à l'origine de la pathogénicité du virus HTLV-1. La protéine Tax notamment, considérée comme l'acteur principal de la transformation des cellules, est l'objet de nombreuses études.

III. TAX, UNE ONCOPROTEINE CHEF-D'ORCHESTRE

La protéine Tax1, que j'appellerai simplement Tax dans ce manuscrit, est une protéine clé dans la multiplication du virus HTLV-1 mais également dans le développement des pathologies notamment la leucémie. En effet, l'expression de la protéine Tax seule est capable d'induire la transformation de fibroblastes de rongeurs ou l'immortalisation de cellules T primaires humaines (Grassmann et al., 1992; Robek and Ratner, 1999; Tanaka et al., 1990). *In vivo*, l'expression de Tax dans des souris transgéniques est également capable d'induire différents types de tumeurs, et notamment des leucémies, en fonction des promoteurs contrôlant l'expression du gène Tax (pour revue (Gatza et al., 2003)).

A. TAX, UNE PROTEINE PLEIOTROPIQUE AVEC UN OBJECTIF UNIQUE : PROLIFERATION ET TRANSFORMATION DES CELLULES

Les propriétés oncogéniques de la protéine Tax reposent sur la perturbation d'un grand nombre de processus cellulaires : cycle cellulaire, apoptose, réparation des dommages à l'ADN... Ces multiples fonctions de la protéine Tax sont associées à sa capacité d'interagir avec une centaine de partenaires et de moduler l'expression de centaines de gènes cellulaires (Boxus et al., 2008; Ng et al., 2001).

1. TAX ET L'ACTIVATION DE NOMBREUSES VOIES DE SIGNALISATION : MULTIPLICATION DES SIGNAUX DE SURVIE ET DE PROLIFERATION

La protéine Tax peut notamment activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération des cellules.

a) PI3K/Akt

La voie de signalisation de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/Akt est activée physiologiquement par des facteurs de croissance et des hormones induisant une prolifération et une survie des cellules. La voie est activée après fixation des ligands sur des récepteurs tyrosine-kinase à la surface des cellules, induisant leur dimérisation et leur autophosphorylation sur des résidus tyrosine (pour revue (Cully et al., 2006)). La PI3K, composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110, peut interagir directement avec les récepteurs ou via des intermédiaires, GRB2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) et GAB (*GRB2-associated binding protein*) (**Figure 33A**). Dans tous

les cas, cette interaction active la sous-unité p110 qui phosphoryle un second messager : le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP2) pour le convertir en phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP3). Le PIP3 recrute ensuite les kinases PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase 1*) et Akt, ou protéine kinase B (PKB), à la membrane plasmique où PDK1 phosphoryle et active Akt. Akt actif peut ensuite phosphoryler et inhiber de nombreux substrats, parmi lesquels, p27, un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire, BAD, une protéine pro-apoptotique et les facteurs de transcription FOXO, également des médiateurs de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure 33B**). Akt inhibe également l'activité GTPase du complexe TSC1-TSC2, ce qui augmente la quantité de RHEB lié au GTP et conduit à l'activation de TOR (*Target Of Rapamycin*), complexe qui va également inhiber l'apoptose et favoriser la synthèse protéique. Comme pour toute voie de signalisation dans la cellule, il existe des mécanismes de régulation inhibiteurs qui permettent à l'activation de n'être que transitoire. Dans ce cas, il s'agit de phosphatases qui déphosphorylent le PIP3 : PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10*) et SHIP-1 (*Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate Phosphatase-1*) (**Figure 33B**).

Cependant, de nombreuses études font état d'une dérégulation de cette voie de signalisation dans plusieurs cancers humains (pour revue (Nicholson and Anderson, 2002)). L'activation de cette voie a été mise en évidence dans des cellules ATLL fraîchement isolées des patients ainsi que dans des lignées cellulaires chroniquement infectées par le virus HTLV-1 (Ikezoe et al., 2007; Jeong et al., 2005a). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PI3K ou de TOR inhibe la croissance des cellules et arrête le cycle cellulaire, soulignant l'importance de cette voie dans la prolifération de ces cellules (Ikezoe et al., 2007). De même, cette voie a été identifiée comme importante pour la transformation par Tax de fibroblastes embryonnaires de rat (Rat-1) ou de cellules T de souris, normalement dépendantes de l'IL-2 pour leur croissance (CTLL-2) (Liu et al., 2001; Yoshita et al., 2012). L'activation de la voie PI3K/Akt a été liée à l'expression de Tax dans les cellules (Jeong et al., 2005a). Tax peut en effet agir sur plusieurs effecteurs de la voie (**Figure 33B**). Tax peut se lier à la sous-unité p85 de la PI3K et ainsi favoriser sa dissociation de la sous-unité catalytique p110 et l'activation de cette dernière (Peloponese and Jeang, 2006). Tax semble également pouvoir agir au niveau de TOR activant plus spécifiquement les effecteurs en aval de cette protéine (Yoshita et al., 2012). Enfin, Tax favorise également l'activation de la voie en réprimant l'expression des régulateurs négatifs, PTEN et SHIP-1 (Cheng et al., 2007; Fukuda et al., 2009).

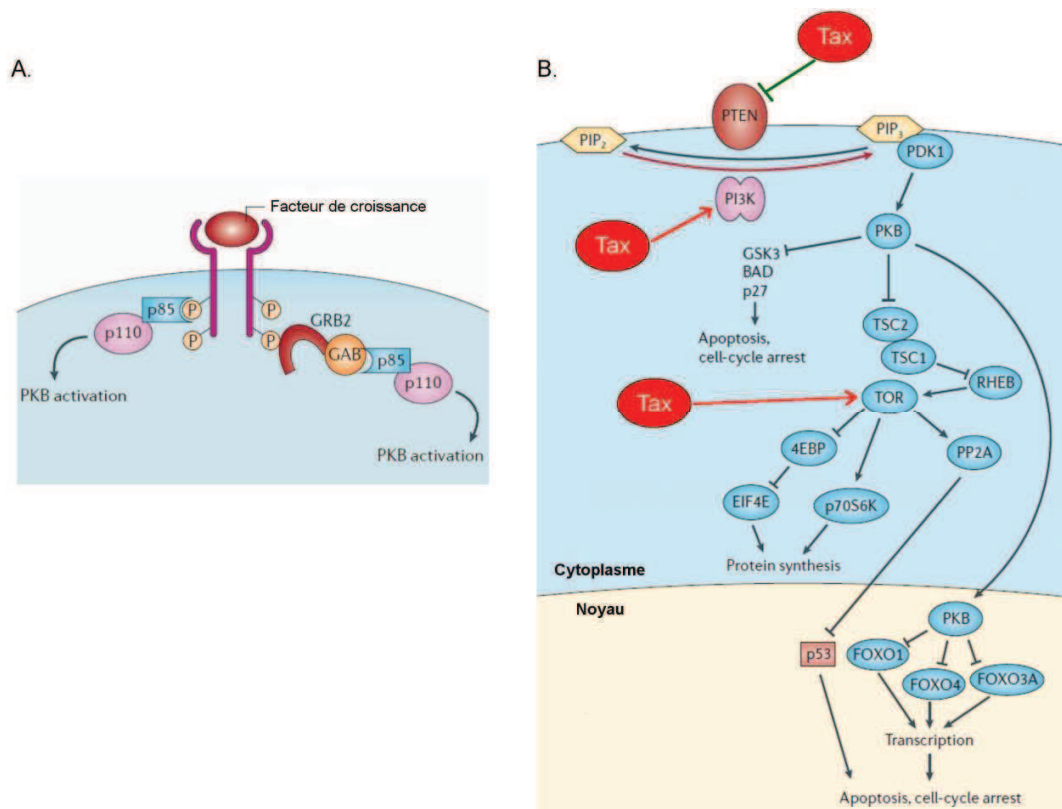


FIGURE 33 : TAX ET LA VOIE PI3K/AKT

A. La protéine PI3K, constituée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110, est activée après interaction directe ou indirecte avec les récepteurs tyrosine-kinase dimérisés par la fixation de leur ligand.

B. Suite à son activation, la PI3K va phosphoryler le PIP₂ en PIP₃ et ainsi induire le recrutement et l'activation d'Akt ou protéine kinase B (PKB) au niveau de la membrane plasmique. Akt va ensuite phosphoryler de nombreux effecteurs aboutissant à la survie cellulaire et la prolifération des cellules. Tax peut interférer à différents niveaux dans cette voie en activant la PI3K ou TOR et en inhibant PTEN, le régulateur négatif de la voie. Adapté de (Cully et al., 2006).

b) MAP Kinases

Les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) sont une famille de protéines cytosoliques organisées en voies de signalisation caractéristiques en 3 modules. Une première kinase est activée, la MAP3K, et va phosphoryler sur une sérine ou thréonine une deuxième kinase, la MAPK Kinase (MAPKK), et l'activer. Celle-ci va ensuite phosphoryler une troisième kinase, la MAPK, sur une sérine et une tyrosine. Cette dernière, ainsi activée, va pouvoir phosphoryler de nombreux effecteurs dans le cytoplasme ou des facteurs de transcription dans le noyau, modulant de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose ou la différenciation (**Figure 34**). Ces voies de signalisation peuvent être activées physiologiquement par de nombreux stimuli extracellulaires tels que facteurs de croissance, cytokines, hormones ou facteurs de stress. Ces stimuli activent différents récepteurs membranaires, notamment tyrosine-kinase ou

couplés aux protéines G, et le signal est transduit jusqu'à la première kinase MAP3K grâce à des adaptateurs ou des petites protéines G, notamment Ras la plus connue (pour revue (Keshet and Seger, 2010)). Le système est en fait un réseau très complexe avec plus de 200 composants. 4 cascades principales ont été clairement identifiées et sont représentées sur la **Figure 34** : la cascade ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), la cascade JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), la cascade p38 et la cascade ERK5 (Keshet and Seger, 2010).

Là encore, la dérégulation de ces cascades a été associée au développement de cancers (pour revue (Dhillon et al., 2007)). Et là encore, l'ATLL ne fait pas exception. En effet l'activation constitutive de la cascade JNK a été mise en évidence dans les cellules ATLL, dans les lymphocytes humains transformés par HTLV-1 *in vitro* ou dans des fibroblastes murins transformés par Tax (Arnulf et al., 2002; Xu et al., 1996). Même si cette dernière étude a suggéré que Tax seul ne pouvait pas activer la voie JNK, l'activation de JNK1 par Tax a été montrée dans différents types cellulaires, incluant des L_T et des lignées transformées par HTLV-1 (Arnulf et al., 2002; Jin et al., 1997) (**Figure 34**). Un des rôles attribués à l'activation de la cascade JNK par Tax est la résistance à l'effet inhibiteur de croissance du TGF β . En phosphorylant c-jun, JNK favorise la formation d'un complexe c-jun/Smad3 empêchant ainsi la fixation de Smad3 à l'ADN et l'activation de la transcription en réponse au TGF β (Arnulf et al., 2002). Tax peut également agir plus en amont dans les cascades : Tax interagit avec MEKK1 (*MAP/ERK Kinase Kinase*) et active l'activité kinase de cette protéine (Yin et al., 1998) (**Figure 34**). Une autre MAP3K est également la cible de Tax dans les cellules : TAK1 (**Figure 34**). La protéine TAK1 est constitutivement active dans les cellules T infectées par HTLV-1, ce qui résulte en l'activation des cascades JNK et p38 dans les cellules (Suzuki et al., 2007; Wu and Sun, 2007). Même si le mécanisme d'activation de TAK1 n'est pas clairement élucidé, il a été montré que Tax interagissait directement avec TAK1 (Wu and Sun, 2007). De plus, Tax active l'expression constitutive de TAB2 (*TAK1 Binding Protein*), cofacteur essentiel à l'activation de TAK1, et interagit avec celui-ci pour activer TAK1 (Suzuki et al., 2007; Yu et al., 2008). Un crible a également montré une interaction de Tax avec des protéines de la famille des petites protéines G (Wu et al., 2004). Une coopération entre Tax et Ras pour activer la cascade ERK et protéger les cellules de l'apoptose a ensuite été suggérée (**Figure 34**). Dans ce modèle, Tax permettrait l'accumulation de Ras-GTP en interagissant avec GAP1m (*GTPase Activating Protein*), un facteur favorisant l'hydrolyse du GTP par Ras et donc son inactivation (Vajente et al., 2009).

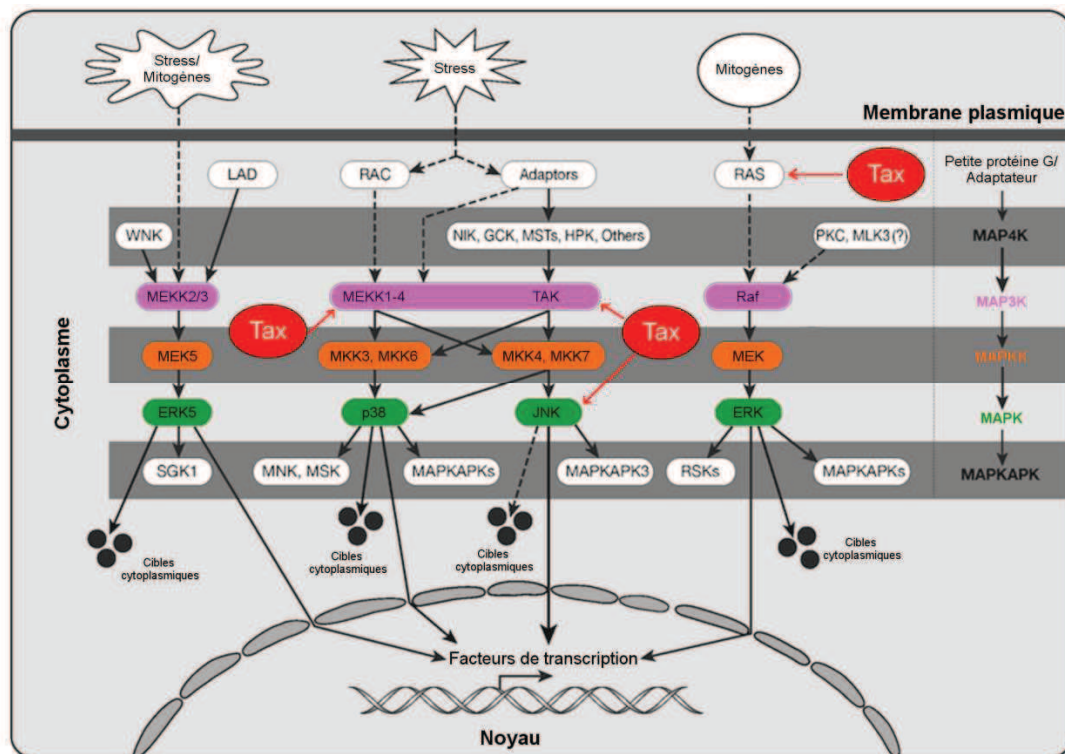


FIGURE 34 : TAX ET LES MAP KINASES

Le système des MAP kinases est très complexe et ne sont ici représentées que les 4 cascades principales de cette voie des MAPK. Chaque cascade est constituée de 3 modules qui sont activées séquentiellement : une MAP3K, une MAPKK et une MAPK. Parfois une kinase en amont (MAP4K) et une kinase en aval (MAPKAPK) sont également nécessaires à l'activation de la cascade. Les kinases effectrices une fois activées vont phosphoryler des substrats cytoplasmiques ou des facteurs de transcription nucléaires. L'interaction de Tax avec ce complexe a été montrée à plusieurs occasions. Ainsi, Tax est capable d'activer la MAPK JNK mais également des MAP3K MEKK-1 et TAK1 découlant dans l'activation des cascades p38 et JNK. Enfin, Tax peut coopérer avec Ras pour activer la cascade ERK. Adapté de (Keshet and Seger, 2010).

c) NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B est une voie essentielle impliquée dans de nombreux processus biologiques : la réponse immunitaire et inflammatoire et la balance survie cellulaire/apoptose notamment. Contrairement aux autres voies de signalisation décrites précédemment, dont les protéines effectrices étaient multiples, à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, l'activation de la voie NF- κ B ne résulte qu'en la modulation de la transcription de nombreux gènes cellulaires grâce aux facteurs de transcription NF- κ B qui se fixent sur les promoteurs à éléments de réponse κ B. Ces facteurs de transcription sont au nombre de 5 : RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1/p50 et NF- κ B2/p52 (**Figure 35**). Toutes les protéines de cette famille possèdent en commun un domaine d'homologie à Rel (RHD) en N-terminal, qui leur permet de se lier spécifiquement à l'ADN, de transloquer dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) et de s'homo- ou

s'hétérodimériser. En C-terminal par contre, alors que RelA, RelB et c-Rel possèdent un domaine d'activation de la transcription, ce n'est pas le cas de p50 et p52 qui doivent donc s'hétérodimériser avec l'un des 3 autres facteurs pour activer la transcription. RelB s'hétérodimérise préférentiellement avec p52 alors que RelA et c-Rel s'hétérodimérise préférentiellement avec p50. Les facteurs p50 et p52 sont en fait synthétisés sous forme de précurseurs, p105 et p100 respectivement. La maturation de p105 en p50 est constitutive dans les cellules mais celle de p100 en p52 est finement régulée et dépend de la stimulation des cellules. Ces précurseurs contiennent plusieurs motifs ankyrine répétés dans leur partie C-terminale, ce qui les rapproche des inhibiteurs de NF- κ B (I κ B). Les I κ B sont aujourd'hui une famille de 8 membres, en comptant p100 et p105, qui ont tous en commun la présence de 5 à 7 motifs ankyrine répétés (**Figure 35**). Grâce à ces motifs ankyrine, les I κ B se lient au domaine Rel des facteurs NF- κ B, masquant ainsi leur NLS et les retenant dans le cytoplasme, loin des promoteurs à activer (pour revue (Kfoury et al., 2012; Vallabhapurapu and Karin, 2009)). L'activation de la voie NF- κ B va permettre la libération des dimères NF- κ B de leur inhibiteur I κ B, permettant leur translocation dans le noyau et l'activation de la transcription. Cette activation est le résultat de nombreux stimuli externes et de la transduction du signal par deux voies principales : les voies NF- κ B canonique et non canonique ou alterne (pour revue (Qu and Xiao, 2011; Skaug et al., 2009; Vallabhapurapu and Karin, 2009)).

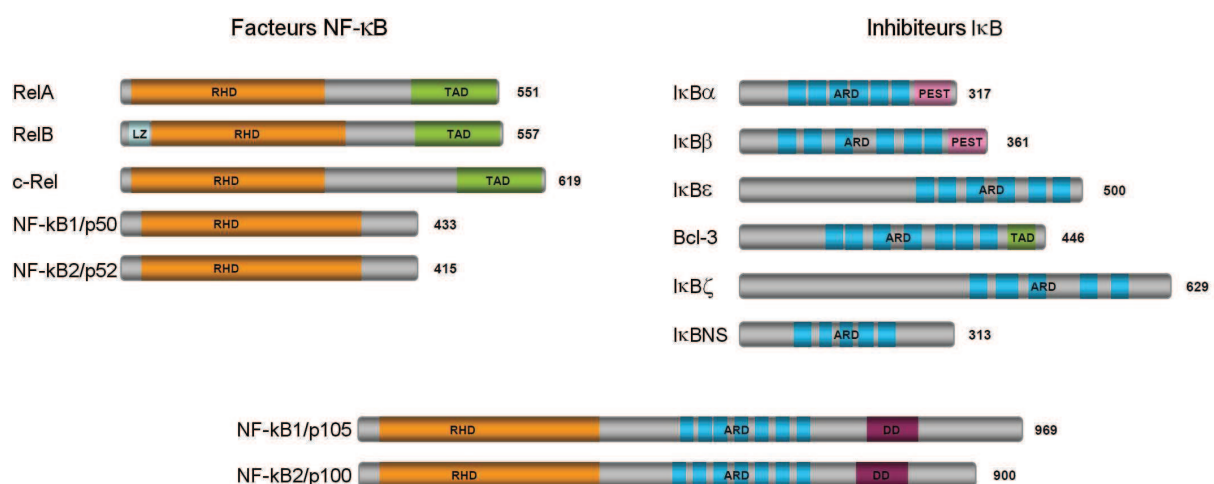


FIGURE 35 : STRUCTURE PROTEIQUE DES FACTEURS NF- κ B ET DES INHIBITEURS I κ B

Les facteurs de transcription NF- κ B ont pour caractéristique commune, la présence d'un domaine d'homologie à Rel (RHD) dans leur partie N-terminale qui contient un signal de localisation nucléaire, leur permet de s'homo- ou s'hétérodimériser et de lier l'ADN. 3 d'entre eux ont également un domaine qui leur permet d'activer la transcription (TAD). Les inhibiteurs I κ B possèdent des motifs répétés ankyrine (ARD) qui leur permettent d'interagir avec le domaine RHD des facteurs NF- κ B et de les retenir dans le cytoplasme. Les protéines p105 et p100, précurseurs de p50 et p52 respectivement, possèdent à la fois les caractéristiques des facteurs NF- κ B et des inhibiteurs I κ B. Adapté de (Xiao and Fu, 2011).

La voie NF- κ B canonique est activée par des pathogènes ou des cytokines notamment. Après fixation des ligands sur leur récepteur membranaire, dont les principaux sont le récepteur du TNF α (TNFR), de l'IL-1 β (IL1R) ou les Toll-like récepteurs (TLR), des molécules adaptatrices, notamment les protéines TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*), sont recrutées au niveau de ces récepteurs et vont ensuite permettre le recrutement de la kinase TAK1 associée à deux sous-unités régulatrices TAB1 et TAB2. Le complexe IKK, composé de deux sous-unités catalytiques IKK α (ou IKK1) et IKK β (ou IKK2) et d'une sous-unité régulatrice IKK γ ou NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*), est également recruté. TAK1 peut ainsi phosphoryler et activer IKK β qui va à son tour phosphoryler I κ B sur des sérines spécifiques (sérines 32 et 36 sur I κ B α). Cette phosphorylation est un signal de reconnaissance pour le complexe ubiquitine ligase SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein*) β TrCP (*β -Transducin repeat-Containing Protein*) qui va ubiquitinyler I κ B et induire sa dégradation par le protéasome 26S. Les dimères NF- κ B, essentiellement RelA/p50, sont ainsi libérés et vont pouvoir passer dans le noyau et se lier à leurs promoteurs cibles (**Figure 36**).

La voie alterne est activée par un nombre beaucoup plus limité de stimuli : BAFF (*B-cell Activating Factor*), lymphotoxine β , ligand de CD40, TWEAK (*TNF-like Weak inducer of apoptosis*) et RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*) et est donc impliquée dans un nombre de processus biologiques restreints : essentiellement organogenèse lymphoïde, survie et maturation des lymphocytes B et métabolisme osseux. Les protéines TRAF sont toujours impliquées mais régulent une autre kinase, NIK (*NF- κ B-Inducing Kinase*). En absence d'activation, la protéine NIK est séquestrée dans le cytoplasme par un complexe TRAF2/TRAF3/cIAP (*cellular Inhibitor of Apoptosis Protein*), cette dernière protéine ubiquitinylant NIK et induisant sa dégradation par le protéasome. Lorsqu'un récepteur est activé, l'ensemble du complexe est recruté au niveau du récepteur et c'est la protéine TRAF3 qui est la cible de l'ubiquitylation et de la dégradation par le protéasome. Ainsi, la protéine NIK est stabilisée et s'accumule. La protéine NIK activée, probablement par autophosphorylation, peut alors phosphoryler et activer IKK α . En effet, alors que IKK β et IKK γ sont essentiels à l'activation de la voie canonique, ils ne sont pas nécessaires à la voie alterne. IKK α phosphoryle ensuite p100 qui, comme pour la voie canonique, va être ubiquitinylé par SCF- β TrCP et dégradé partiellement par le protéasome pour libérer p52 qui va ainsi pouvoir se fixer sur ses promoteurs cibles associé à RelB (**Figure 36**).

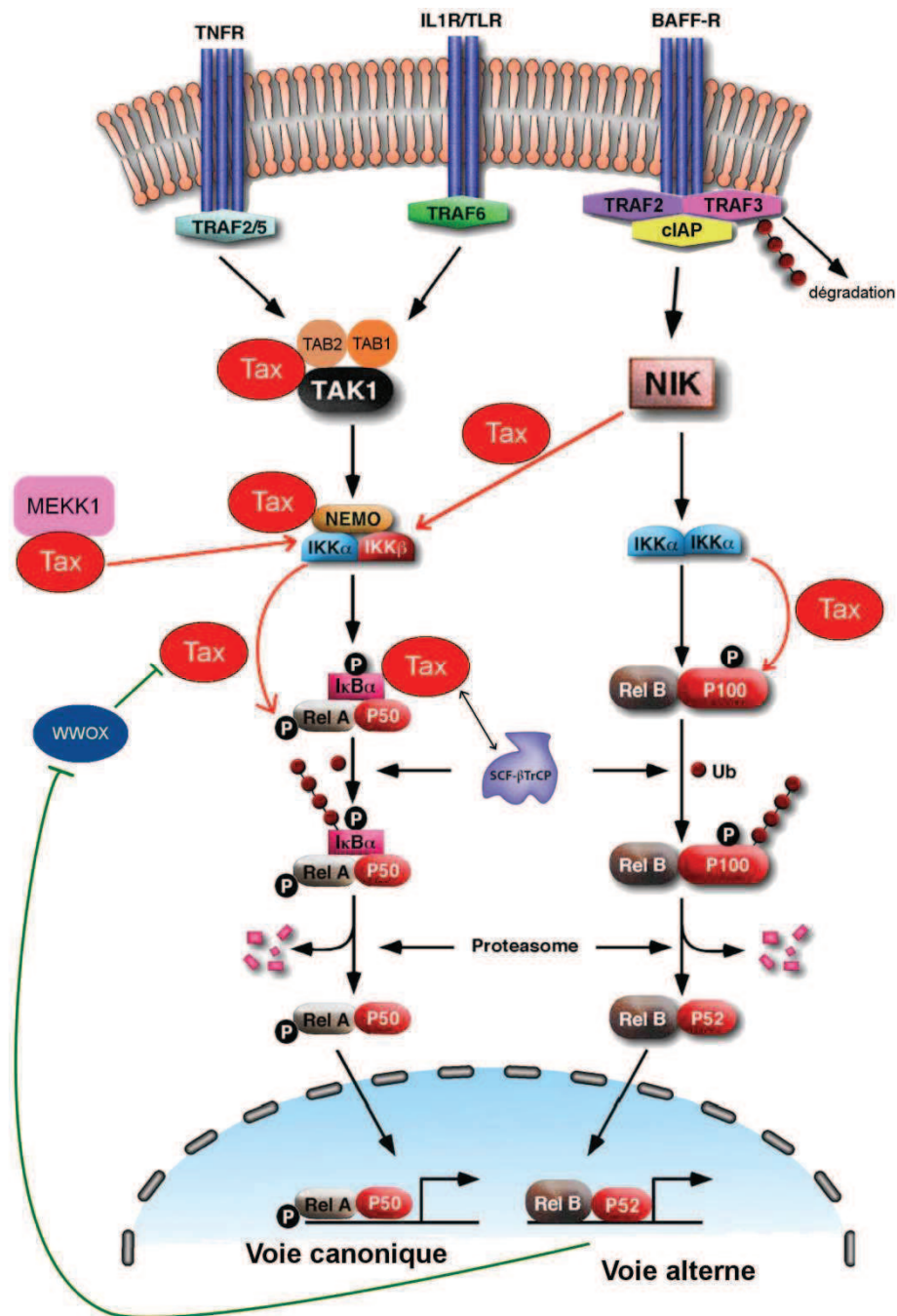


FIGURE 36 : TAX ET L'ACTIVATION DE NF-κB

Tax active à la fois la voie NF-κB canonique et alterne à de nombreux niveaux. Les liens activateurs sont figurés en rouge alors que les liens inhibiteurs sont figurés en verts. L'activation des deux voies est coordonnée grâce à la répression par la voie alterne de l'expression de WWOX, un inhibiteur de l'activation de la voie canonique par Tax. Adapté de (Chen, 2005).

La dérégulation de la voie NF-κB a été observée dans de nombreux cancers (Xiao and Fu, 2011). C'est également le cas dans les cellules ATLL isolées de patients mais aussi les cellules transformées par HTLV-1 *in vitro* ou encore les cellules n'exprimant que Tax (Kfoury et al., 2012). Ainsi, l'expression de la protéine Tax seule est suffisante pour activer la voie NF-κB de façon permanente, en agissant à de nombreux niveaux de cette voie (**Figure 36**).

Tout d'abord, Tax cible le complexe clé de la voie NF- κ B, le complexe IKK. Il a d'abord été observé que dans les cellules exprimant Tax, I κ B α était constitutivement phosphorylé et rapidement dégradé (Lacoste et al., 1995; Sun et al., 1994). En effet, bien que la quantité d'ARNm codant I κ B α soit 7 à 20 fois plus importante dans les cellules exprimant Tax que dans des cellules négatives, I κ B α sous forme protéique est beaucoup moins détecté dans les premières. Cette dégradation est associée à une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs NF- κ B. Cette phosphorylation et dégradation de I κ B α a rapidement été associée à une activation constitutive de IKK α et IKK β dans les cellules exprimant Tax ou infectées par HTLV-1 (Chu et al., 1998; Geleziunas et al., 1998; Uhlik et al., 1998). Plus précisément, cette activation a été reliée à la capacité de Tax d'interagir avec le complexe IKK (Chu et al., 1998). En parallèle, grâce à une étude de complémentation dans des cellules Rat1 déficientes pour l'activation de la transcription NF- κ B induite par Tax, la protéine NEMO a été identifiée (Yamaoka et al., 1998). Il s'est avéré que cette protéine NEMO était un membre du complexe IKK et était essentiel à l'activation de l'activité NF- κ B, non seulement par Tax, mais aussi par de nombreux autres stimuli. Les études suivantes ont montré que NEMO permettait de faire le lien entre Tax et le complexe IKK et donc d'activer le complexe IKK (Chu et al., 1999; Harhaj and Sun, 1999; Jin et al., 1999). En effet, Tax peut interagir directement avec NEMO. Les domaines protéiques importants pour cette interaction sont deux domaines leucine zipper en N-terminal et C-terminal du côté de NEMO et une région riche en leucines de Tax (Sun et al., 2000; Xiao et al., 2000).

Alors que l'activation physiologique de la voie passe par un recrutement des différents complexes au niveau des récepteurs membranaires, l'interaction de Tax avec le complexe IKK induit son recrutement dans des structures périnucléaires associées à l'appareil de Golgi ou au centrosome (Harhaj et al., 2007; Kfoury et al., 2008). Une étude a même permis de déterminer que Tax relocalisait le complexe IKK au niveau des radeaux lipidiques du Golgi et la perturbation des radeaux lipidiques dans les cellules affecte la capacité de Tax à activer IKK (Huang et al., 2009). Cependant, le mécanisme d'activation constitutive du complexe IKK par Tax, qui se traduit par la phosphorylation des sous-unités catalytiques et de NEMO (Carter et al., 2001), n'est pas encore complètement élucidé. Comme Tax a la capacité de s'oligomériser, il a été suggéré que Tax pouvait favoriser la phosphorylation et l'activation croisée des sous-unités catalytiques (Sun and Yamaoka, 2005). Cependant une étude

récente, menée *in vitro*, a montré que l'interaction de Tax avec le complexe IKK ne suffisait pas à son activation mais nécessitait la présence d'autres facteurs cytosoliques (Shibata et al., 2011). Une autre possibilité est donc le recrutement par Tax d'autres kinases qui pourraient phosphoryler les sous-unités catalytiques d'IKK. Plusieurs kinases candidates ont été identifiées. Des études ont tout d'abord montré que la protéine kinase NIK était nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B par Tax (Geleziunas et al., 1998; Uhlik et al., 1998). Une autre étude a impliqué la protéine MEKK1 dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax, montrant que Tax pouvait interagir avec MEKK1 et stimuler son activité kinase alors qu'un dominant négatif de MEKK1 inhibait l'activation de NF- κ B par Tax (Yin et al., 1998). Cependant, l'utilisation de siARN inhibant l'expression de MEKK1 n'affecte pas l'activation de NF- κ B par Tax, remettant en cause la conclusion précédente (Gohda et al., 2007). Enfin, un rôle de TAK1 dans l'activation de NF- κ B par Tax a été suggéré par plusieurs études même si là-encore les résultats sont controversés. En effet, Tax peut interagir directement avec TAK1 et recruter cette protéine au niveau du complexe IKK (Wu and Sun, 2007). Cette même étude a également montré que la présence de TAK1 était essentielle pour l'activation de l'activité NF- κ B par Tax mais pas suffisante. Le recrutement de TAK1 au niveau des radeaux lipidiques où se trouvent Tax et IKK a également été montré (Huang et al., 2009). De même l'interaction de Tax avec l'une des sous-unités régulatrices de TAK1, TAB2, semble nécessaire à l'activation de NF- κ B par Tax (Avesani et al., 2010; Yu et al., 2008). Cependant, deux études ont au contraire montré que l'inhibition de TAK1 par siARN ou inhibiteur chimique, n'altérerait pas la capacité de Tax à induire l'activité NF- κ B, suggérant que TAK1 ne joue pas de rôle dans cette activation (Gohda et al., 2007; Suzuki et al., 2007). Ces résultats controversés sur le rôle de différentes kinases en amont du complexe IKK peuvent peut-être s'expliquer par la capacité de Tax à recruter plusieurs kinases différentes dans le même but de phosphoryler IKK, expliquant que l'inhibition de l'une ou l'autre des kinases n'ait pas d'effet sur ces fonctions redondantes.

Une autre cible de Tax est directement I κ B (**Figure 36**). En effet, Tax peut interagir avec les différents membres de la famille I κ B, et notamment I κ B α , grâce à leurs motifs ankyrine (Hirai et al., 1994; Petropoulos and Hiscott, 1998; Suzuki et al., 1995). Cette interaction induit une libération des facteurs NF- κ B dans le noyau et une activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B (Petropoulos et al., 1996). De plus, en

interagissant également avec le protéasome, et particulièrement les sous-unités HsN3 et HC9, Tax renforce l'interaction des I κ B avec le protéasome favorisant ainsi leur dégradation constitutive sans phosphorylation ou ubiquitinylation préalable (Petroopoulos and Hiscott, 1998; Rousset et al., 1996).

En interférant avec la liaison du dimère NF- κ B à I κ B, Tax bloque un système de rétrocontrôle négatif de la voie puisque l'expression de I κ B α est elle-même activée par les facteurs NF- κ B et les protéines I κ B α néo-synthétisées peuvent ensuite retourner dans le noyau et déplacer les dimères NF- κ B fixées sur l'ADN (Suzuki et al., 1995). Tax est capable de bloquer un autre système de régulation négative de la voie NF- κ B en formant un complexe ternaire stable avec NEMO et PP2A, une sérine/thréonine phosphatase qui diminue l'activité des complexes IKK activés *in vitro*. Or en présence de Tax, cette capacité de PP2A à inactiver le complexe IKK est diminuée (Fu et al., 2003).

Même si l'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax est la plus étudiée, Tax active également la voie alterne (**Figure 36**). En effet, Tax est capable d'interagir avec p100 et d'induire son clivage en p52 (Higuchi et al., 2007; Lanoix et al., 1994). Cette induction passe par le recrutement de IKK α et de IKK γ , alors qu'IKK α seul suffit dans la voie physiologique. Au contraire elle ne semble pas requérir l'intervention de NIK (Xiao et al., 2001). Le recrutement de IKK α va permettre la phosphorylation de différentes sérines de p100 et induire sa dégradation partielle par le complexe SCF- β TrCP (Qu et al., 2004).

Dans la cellule, Tax est capable de coordonner l'activation des deux voies NF- κ B. Il a en effet été montré que l'activation de la voie alterne permet de réprimer l'expression du gène *WWOX*. Or ce gène suppresseur de tumeur code une protéine, WWOX, qui inhibe spécifiquement l'activation de la voie canonique par Tax en l'empêchant d'induire le recrutement et la phosphorylation activatrice de p65 par IKK α (Fu et al., 2011).

L'activation de différentes voies de signalisation par Tax a de nombreuses conséquences sur les processus cellulaires, entre autres sur l'expression génique. En effet, parmi les cibles des voies de signalisation décrites ci-dessus se trouvent de nombreux facteurs de transcription, notamment impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Tax peut donc activer la transcription à l'issue de l'activation d'une voie de signalisation mais également en interagissant directement avec les facteurs de transcription.

2. TAX ET LA MODULATION DE L'EXPRESSION DES GENES CELLULAIRES : DE NOMBREUSES CIBLES

La dérégulation de l'expression de très nombreux gènes cellulaires a été observée dans des cellules infectées par le virus HTLV-1 (Pise-Masison et al., 2002). L'expression de la seule protéine Tax dans des cellules est capable de déréguler l'expression d'environ 300 gènes sur 2000 étudiés (Ng et al., 2001). Tax peut aussi bien réprimer l'expression des gènes jusqu'à 10 fois que l'activer jusqu'à 30 fois. Pour cela, Tax peut agir au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau post-transcriptionnel.

a) Activation des facteurs de transcription

(1) CREB/ATF

Il a très vite été évident que Tax activait le LTR viral grâce au recrutement des facteurs de transcription de la famille CREB/ATF sur des séquences CRE-like (pour revue (Boxus et al., 2008; Kashanchi and Brady, 2005)). Pourtant l'activation par Tax des promoteurs cellulaires avec des éléments de réponse CRE consensus n'a pas toujours été aussi claire (Yin et al., 1995). Cependant, il a été montré depuis que Tax induisait l'expression de plusieurs gènes cellulaires, *IL-17* et *c-fos* notamment, grâce à son interaction avec les facteurs CREB/ATF (Alexandre and Verrier, 1991; Dodon et al., 2004). D'autres promoteurs sont également activés par Tax, entre autres grâce aux facteurs CREB : les LTR de rétrovirus endogènes, notamment HERV-W8 et HERV-H. Cette activation peut déréguler l'expression des gènes cellulaires situés à proximité de ces LTR. En fonction de leur site d'insertion dans le génome humain, ce mécanisme pourrait faire partie des prédispositions génétiques de certaines personnes infectées à développer des maladies (Toufaily et al., 2011). Le mécanisme d'activation des promoteurs cellulaires semble très proche de celui décrit pour le LTR viral. Par exemple, l'activation du promoteur de la cycline D1 nécessite la liaison de Tax à l'élément de réponse CRE ainsi que la présence de CREB phosphorylé et le recrutement de p300. De plus, comme pour le LTR viral, TORC2 coopère avec Tax pour activer l'expression du gène *cycline D1* (Kim et al., 2010).

Outre la capacité de Tax à interagir directement avec les facteurs de transcription ATF/CREB et de favoriser leur recrutement, ainsi que celui des cofacteurs, sur les promoteurs, Tax induit également la phosphorylation de CREB, favorisant ainsi son interaction avec les cofacteurs CBP/p300 (Trevisan et al., 2004). Il a notamment été montré

que le facteur ATF-2 était une cible de la voie des MAP kinases TAK1-JNK, deux kinases constitutivement actives en présence de Tax (Suzuki et al., 2007). Un mécanisme inhibiteur de CREB a récemment été montré : la phosphatase PTEN induit la déphosphorylation de CREB (Gu et al., 2011). Or l'expression de PTEN est réprimée par Tax (Fukuda et al., 2009).

Le recrutement des facteurs CREB/ATF par Tax peut également induire une activité répressive sur certains promoteurs tels que ceux des gènes codant la cycline A, la cycline D3 ou l'ADN polymérase α (Kibler and Jeang, 2001). Cette répression s'applique également aux promoteurs activés normalement par le facteur de transcription p53 qui coordonne la réponse aux dommages à l'ADN (arrêt du cycle cellulaire, réparation des dommages et apoptose). Alors que Tax n'altère pas la capacité de p53 de se lier à l'ADN, l'activation d'ATF/CREB par Tax est importante pour bloquer la fonction transactivatrice de p53 (Mulloy et al., 1998). Cela pourrait être dû à une compétition pour le recrutement des cofacteurs transcriptionnels CBP/p300.

(2) AP-1

AP-1 (*Activator Protein-1*) est un facteur de transcription homo- ou hétérodimérique formé de l'association de protéines Fos (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2) et Jun (c-Jun, JunB et JunD). Or ce facteur de transcription est constitutivement activé et lié à l'ADN dans les cellules ATLL (Fujii et al., 2000; Mori et al., 2000). Cette activation constitutive est notamment liée à Tax qui induit la liaison des facteurs AP-1 à l'ADN dans des cellules T (Fujii et al., 2000; Iwai et al., 2001). Cette activation de AP-1 par Tax serait la conséquence de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et favoriserait la multiplication et la survie cellulaire (Peloponese and Jeang, 2006).

Outre sa capacité à activer les facteurs AP-1, l'expression de Tax induit également l'expression de ces facteurs de transcription, les protéines Fos et Jun (Fujii et al., 1991). Or ces gènes sont également activés précocement en réponse au sérum.

(3) SRF

SRF (*Serum Response Factor*) est un facteur de transcription activé par de nombreux stimuli (facteurs de croissances, cytokines, signaux de stress...) et est impliqué en retour dans la transcription de gènes régulant le cycle cellulaire, l'apoptose.... L'activation de l'expression des gènes Fos et Jun par Tax supposait l'activation du facteur SRF (Alexandre

and Verrier, 1991; Fujii et al., 1991). Il a en effet été montré que Tax pouvait interagir avec SRF et augmentait ainsi sa fixation sur le motif vCARG des éléments de réponse au sérum (SRE) présents dans le promoteur de certains gènes cellulaires, induisant ainsi leur transcription (Suzuki et al., 1993; Winter and Marriott, 2007). De façon intéressante, en présence de Tax, SRF est capable de se lier à des motifs vCARG plus divergents qu'en son absence (Winter and Marriott, 2007). Comme pour l'activation des sites CRE, l'activation des promoteurs contenant un SRE nécessite le recrutement par Tax d'autres facteurs, notamment TCF (*Ternary Complex Factor*) qui se fixe sur un autre motif du SRE, le motif Ets, et les co-activateurs CBP/p300 (Shuh and Derse, 2000). Il est à noter qu'un motif vCARG est également présent dans le LTR proviral, au niveau de l'élément de réponse TRE-2, entre deux séquences TRE-1, et que Tax favorise aussi la liaison de SRF sur ce motif (Winter and Marriott, 2007; Wycuff et al., 2004).

(4) NF- κ B

Comme cela a déjà été décrit, Tax a la capacité d'activer la voie de signalisation NF- κ B, aboutissant à la libération des facteurs de transcription NF- κ B dans le noyau. Mais Tax peut également interagir directement avec ces facteurs de transcription dans le noyau. En effet, Tax interagit avec le domaine d'homologie Rel des facteurs NF- κ B et se lie ainsi sur les éléments de réponse κ B des promoteurs (Pepin et al., 1994; Suzuki et al., 1993; Suzuki et al., 1994). De plus, il a été montré que Tax augmentait fortement la liaison à l'ADN des dimères NF- κ B, notamment en favorisant la formation de dimères même en absence d'ADN (Crenon et al., 1993; Petropoulos et al., 1996). De plus, l'importance de CBP/p300 dans l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B a également été suggérée (Bex et al., 1998). Un complexe ternaire Tax-RelA-CBP serait formé dans le cytoplasme et pourrait ensuite passer dans le noyau et activer la transcription (Azran et al., 2005) (**Figure 36**).

Tax et les facteurs de transcription NF- κ B induisent ainsi l'expression de nombreux gènes, mais peuvent aussi réprimer l'expression génique. En effet, la répression par Tax de l'expression des gènes PTEN et SHIP-1 décrite ci-dessus est associée à sa capacité d'activation de NF- κ B (Fukuda et al., 2009). Dans le cas du gène SHIP-1, il a été proposé que Tax recrute l'histone déacétylase HDAC1 sur le promoteur, déplaçant ainsi les facteurs NF- κ B et induisant la déacétylation des histones et donc la répression de la transcription (Cheng et al., 2007).

Un même mécanisme d'activation des facteurs de transcription semble se dégager de toutes ces observations. Tax, en interagissant avec les facteurs de transcription, facilite leur liaison à l'ADN au niveau des séquences régulatrices. Tax favorise également le recrutement de facteurs de transcription généraux, comme cela a été montré pour le LTR proviral, et de cofacteurs, notamment les histones acétylases CBP/p300, augmentant d'autant plus la transactivation de ces promoteurs. Il semblerait cependant qu'il existe une spécificité de recrutement entre ces deux co-activateurs très proches, en fonction des facteurs de transcription activés. En effet, une étude a montré que des mutants de Tax n'activant que NF- κ B ou CREB colocalisaient respectivement avec p300 ou CBP (Bex et al., 1998). En recrutant les facteurs de transcription sur certains promoteurs spécifiques, Tax peut également réprimer l'expression de certains gènes.

b) Une régulation post-transcriptionnelle

Bien que Tax soit principalement connu pour ses fonctions d'activateur transcriptionnel, une étude récente a montré que Tax pouvait également agir à d'autres niveaux de l'expression génique et notamment au niveau post-transcriptionnel. Tax peut en effet stabiliser certains ARNm en les protégeant d'un processus de contrôle qualité, le NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) qui dégrade notamment les ARNm présentant un codon stop prématuré pouvant engendrer la traduction de protéines tronquées (Mocquet et al., 2012) (**Figure 37**). Ce processus se déroule dans des corps cytoplasmiques appelés P-bodies (*Processing bodies*). Tax peut interagir avec deux composants importants pour le bon fonctionnement du NMD : INT6 et UPF1 (Mocquet et al., 2012). Il avait été précédemment montré que Tax et INT6 pouvait interagir et que Tax induisait alors une relocalisation de INT6 dans la cellule (Desbois et al., 1996). Tax, en séquestrant INT6 en dehors des P-bodies et en l'empêchant de former un complexe avec UPF1, inhiberait fortement le NMD. De plus, l'interaction de Tax avec UPF1 est associée à une augmentation de sa forme phosphorylée dans les P-bodies. Or UPF1 est phosphorylé lors de la reconnaissance d'un ARNm à dégrader par NMD mais, après l'arrivée dans les P-bodies, UPF1 est déphosphorylé et recyclé. En bloquant l'action de la phosphatase sur UPF1, Tax induit donc son accumulation dans les P-bodies et le blocage du NMD (Mocquet et al., 2012). En stabilisant ainsi certains ARNm viraux ou cellulaires normalement destinés à la dégradation, comme par exemple ceux codant ATF4/CREB2, Tax peut favoriser leur expression en agissant après leur transcription.

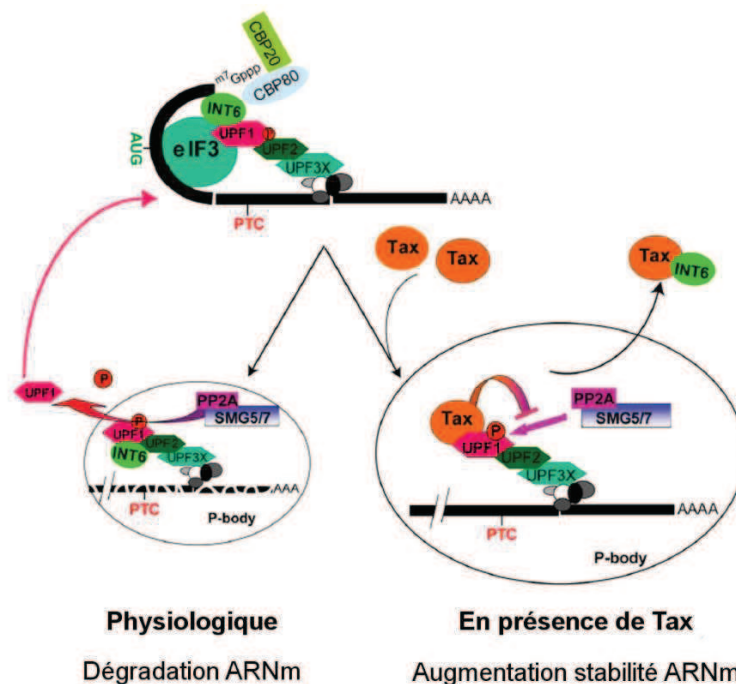


FIGURE 37 : INHIBITION DU NMD PAR TAX

La reconnaissance d'une jonction exon-exon en aval d'un codon stop dit pré-mature (PTC) va induire la redirection de l'ARNm vers des structures cytoplasmiques appelées P-bodies pour subir une dégradation dans un processus appelé NMD (*Nonsense-Mediated Decay*). De nombreuses protéines sont impliquées dans le bon fonctionnement de ce processus et notamment INT6 et UPF1, deux protéines ciblées par Tax pour inhiber le processus et stabiliser les ARNm. En interagissant avec INT6, Tax diminue sa présence dans les P-bodies. Au contraire, Tax est présent dans les P-bodies et peut interagir avec UPF1 bloquant sa déphosphorylation et son recyclage dans le noyau. UPF1 s'accumule donc dans les P-bodies. Adapté de (Mocquet et al., 2012).

Toutes les actions régulatrices de Tax sur les voies de signalisation et les facteurs de transcription présentées précédemment l'ont été séparément par souci de clarté. Cependant, dans la cellule, toutes ces voies sont interconnectées (**Figure 38**). Nous avons déjà vu que l'activation de la voie MAP kinase JNK pouvait induire la phosphorylation et donc l'activation de certains membres de la famille ATF/CREB (Suzuki et al., 2007). Des MAP3K (MEKK1 et TAK1) ont également été impliquées dans l'activation des voies NF- κ B. De même, l'activation de la voie PI3K/Akt peut permettre l'activation des facteurs de transcription AP-1 (Peloponese and Jeang, 2006). L'activation de la voie NF- κ B, notamment grâce à la séquestration de p300 par p65, réprime l'expression de PTEN vont favoriser l'activation constitutive à la fois de la voie PI3K/Akt et de CREB (Fukuda et al., 2009; Fukuda et al., 2012). A son tour, il a également été montré que l'activation de Akt était associée à une activation de la voie NF- κ B (Jeong et al., 2005a). De plus, il est connu que la cascade ERK des MAP kinases, et notamment Ras, peut induire l'activation de la PI3K. Enfin, un dernier exemple de ces interconnexions des voies activées par Tax est l'augmentation de l'expression des sous-

unités du facteur de transcription AP-1 grâce au facteur de transcription SRF (Fujii et al., 1991). Ainsi même si des études ont mis en avant l'importance de l'activation des voies NF- κ B (Robek and Ratner, 1999), CREB (Rosin et al., 1998) ou SRF (Matsumoto et al., 1997) dans l'immortalisation de lymphocytes T primaires ou la transformation de cellules Rat1 par Tax, il est plus probable que l'ensemble de ces voies coopèrent pour altérer de nombreux processus cellulaires et aboutir à la transformation des cellules, comme cela a été suggéré dans une autre étude (Akagi et al., 1997).

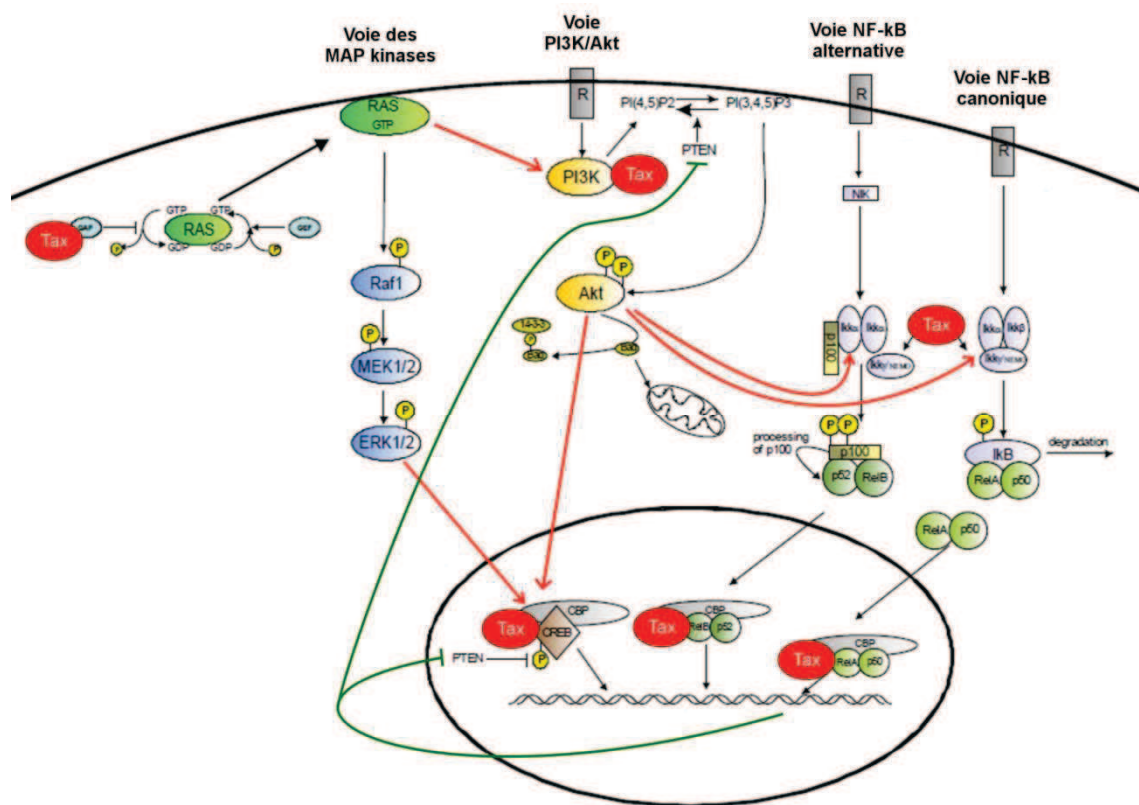


FIGURE 38 : TAX ACTIVE UN RESEAU DE VOIES INTERCONNECTEES

Tax a un effet modulateur sur de nombreuses voies de signalisation mais les conséquences ne s'arrêtent pas à cette seule voie et ont souvent des répercussions sur les autres voies cellulaires grâce à des connexions, induites ou non par Tax, qui existent entre ces voies. Les principales connexions activatrices sont figurées en rouge alors que les connexions réalisées grâce à une action inhibitrice sont figurées en vert. Adapté de (Saggiaro, 2011).

3. TAX ET LA STIMULATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE

a) Un effet indirect : les boucles autocrines ou paracrines de cytokines

De nombreuses études ont montré que Tax était capable d'induire la production de cytokines par les cellules infectées mais également l'expression des récepteurs de ces

cytokines. La mise en évidence de la capacité de Tax à activer à la fois l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (IL-2R α) et de l'IL-2 elle-même a très tôt suggéré la possibilité d'une stimulation de la prolifération des cellules grâce à l'action autocrine ou paracrine des cytokines (Inoue et al., 1986; Maruyama et al., 1987; Siekevitz et al., 1987). L'activation de l'expression de IL-2R α a été associée à l'activation de NF- κ B par Tax alors que l'expression de l'IL-2 nécessite plutôt l'activation du facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*) par Tax (Ballard et al., 1988; Good et al., 1996; Hoyos et al., 1989; Ruben et al., 1988). Les mêmes observations ont été faites avec l'IL-21, cytokine qui peut activer la prolifération des L_T, en particulier des cellules ATLL (Ueda et al., 2005). La transactivation par Tax des promoteurs de l'IL-21 et du récepteur à l'IL-21 grâce à la coopération de plusieurs facteurs de transcription a été démontrée par Mizuguchi *et al.*, confortant l'idée de l'existence de boucles autocrines ou paracrines stimulant la prolifération des cellules sous l'impulsion de Tax (Mizuguchi et al., 2009).

b) Un effet direct : l'accélération du cycle cellulaire

Pour favoriser la prolifération des cellules, Tax est également capable d'activer le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est découpé en 4 phases : une phase G1 de croissance et préparation de la réplication, une phase S de réplication de l'ADN, une phase G2 de croissance et préparation de la mitose et une phase M de mitose, c'est-à-dire division de la cellule en deux cellules filles (**Figure 39**). La progression du cycle est contrôlée par l'activité des kinases dépendantes des cyclines (CDK, *Cyclin-dependent kinase*). Ces CDK sont associées comme leur nom l'indique à des cyclines qui vont réguler leur activité en modulant les substrats cibles. Ainsi, en fonction des phases du cycle, différentes combinaisons de cycline-CDK vont induire la progression du cycle. La disponibilité notamment des cyclines est donc finement régulée au cours des différentes phases du cycle par régulation de leur expression. D'autres effecteurs, notamment kinases et phosphatases, peuvent également contrôler l'activité des complexes cycline-CDK ainsi que des inhibiteurs bien identifiés. p21 et p27 notamment sont des inhibiteurs des CDK1 et 2 alors que les inhibiteurs de la famille INK4 ciblent spécifiquement CDK4 et CDK6 (**Figure 39**). Le cycle peut également être arrêté en cas de détection d'une anomalie avant le passage à la phase suivante grâce à des points de contrôle placés à toutes les étapes stratégiques du cycle (**Figure 39**). Le premier point de

contrôle est le point de restriction qui, en fonction de l'état de la cellule, va lui permettre d'entrer dans le cycle cellulaire ou au contraire de rester en phase G0 de quiescence. Durant la phase S, un point de contrôle permet également l'arrêt du cycle en cas de problème dans la réplication de l'ADN. Le point de contrôle G2/M à la fin de la phase G2 permet de vérifier que la cellule a tout le matériel nécessaire pour se diviser. Enfin, durant la mitose, le point de contrôle du fuseau mitotique permet de vérifier que tous les chromosomes sont correctement alignés au centre du fuseau mitotique. Si aucun problème n'est détecté, l'activation du complexe ubiquitine ligase APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) va déclencher la séparation des chromatides sœurs et leur migration vers chacun des pôles de la cellule, notamment grâce à la dégradation de la sécurine. Une fois la sécurine dégradée, la séparase est active et va dégrader les cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs associées au niveau du centromère.

FIGURE 39 : DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR TAX

La protéine Tax est capable d'activer l'entrée dans le cycle des cellules infectées et d'accélérer ce cycle en jouant à la fois sur les complexes cycline-CDK et sur le passage des points de contrôle.

(1) L'ACCELERATION DE LA TRANSITION G1/S : VERS UNE PROLIFERATION CELLULAIRE ACCENTUEE

Le premier effet identifié de Tax sur le cycle cellulaire est sa capacité à accélérer la transition G1/S du cycle cellulaire des cellules infectées, comme c'est d'ailleurs le cas pour de nombreux virus oncogènes. Au niveau moléculaire, l'entrée en phase S est marquée par la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) et la libération du facteur de transcription E2F (**Figure 39**). Cet effet est notamment très visible sur une culture de cellules synchronisées où l'expression de Tax accélère la phase G1 sans pour autant changer la durée de la phase S (Lemoine and Marriott, 2001). Diminuant le temps imparti à la croissance, les cellules paraissent plus petites. Le mécanisme de cette activation précoce de la transition G1/S a été très étudié et là-encore Tax agit à plusieurs niveaux de la régulation (**Figure 39**).

Tout d'abord, Tax active l'expression notamment des cyclines D1 et D2 (Akagi et al., 1996; Huang et al., 2001; Kim et al., 2010; Santiago et al., 1999). Cette surexpression, observée également dans des cellules de patients, va favoriser l'association de la cycline D2 avec d'autres CDK que la CDK6 habituelle et notamment avec CDK4 (Santiago et al., 1999). Une autre étude a montré que, outre les cyclines, Tax est capable de moduler l'expression de nombreuses autres protéines impliquées dans la transition G1/S notamment grâce à sa capacité à activer la voie NF- κ B. En effet, Tax active l'expression de CDK2, 4 et 6, de la cycline E et de E2F1 alors qu'au contraire Tax réprime l'expression des inhibiteurs p19^{INK4d} et p27^{Kip1} (Iwanaga et al., 2001). La répression de l'expression de p18^{INK4c} a également été observée (Akagi et al., 1996; Suzuki et al., 1999a).

Indépendamment de son activité à distance sur les promoteurs cellulaires, Tax peut également interagir directement avec les acteurs du cycle cellulaire. Notamment, Tax va augmenter l'activité des complexes cycline D/CDK favorisant ainsi la phosphorylation de pRb (Neuveut et al., 1998). En interagissant directement avec CDK4, Tax facilite son association avec la cycline D et augmente son activité kinase (Haller et al., 2002). De plus, Tax interagit avec un motif ankyrine des inhibiteurs p16^{INK4a} et p15^{INK4b} et les inactive (Low et al., 1997; Suzuki et al., 1996; Suzuki et al., 1999a). Ajoutée à l'inhibition transcriptionnelle de p18^{INK4c} et p19^{INK4d} décrite précédemment, Tax lève ainsi toutes les inhibitions qui peuvent peser sur CDK4. Enfin, une étude a également montré que Tax pouvait interagir directement avec pRB hypophosphorylé et induire sa dégradation par le protéasome (Kehn et al., 2005). Une fois la transition G1/S induite, une étude très récente a montré que Tax augmente le nombre

d'origines de réplication activées en début de phase S en recrutant notamment le complexe hélicase de maintenance des minichromosomes MCM2-7 et p300, une histone acétylase. Grâce à une hyperacétylation des histones, Tax va modifier le programme temporel de la réplication en activant précocement la réplication à partir d'origines de réplifications normalement tardives mais devenues accessibles. Ce mécanisme va augmenter le taux de réplication des cellules et accélérer la phase S (Boxus et al., 2012).

(2) L'ACCELERATION DE LA FIN DU CYCLE : UNE QUESTION DE SELECTION

Plus récemment, il a été mis en évidence que Tax pouvait également accélérer la progression du cycle après la réplication mais avec cette fois-ci un bénéfice beaucoup plus controversé. En effet, une première étude a montré que Tax induisait une activation prématurée du complexe APC/C, dès la phase S, et donc une dégradation des cyclines A et B et de la sécurine (Liu et al., 2003) (**Figure 39**). L'activation du complexe APC/C passe par l'interaction de Tax avec deux de ses sous-unités : Cdc20 et Cdc27 (Liu et al., 2005). Mais il a également été montré que Tax pouvait interagir avec les protéines à domaine PDZ (*PSD95*, *Dlg*, *ZO-1*) (**Figure 47**) et notamment avec le suppresseur de tumeur hDlg (*human Disks large homolog*). Or Tax en interagissant avec hDlg et en induisant sa phosphorylation annule l'effet inhibiteur de cette protéine sur APC/C (Suzuki et al., 1999b). Cette activation anticipée du complexe APC/C entraîne un retard voire un échec de l'entrée en mitose. Ce découplage entre la réplication, fortement activée, et la mitose, bloquée, entraîne la formation de cellules géantes multinuclées (Liang et al., 2002; Yang et al., 2011). Ce mécanisme pourrait être l'une des explications de l'aneuploïdie sévère observée dans les cellules ATLL et les cellules infectées par HTLV-1 en général (Liu et al., 2005). Cependant, l'activation prématurée de APC/C n'a pas pour seule conséquence le blocage de la mitose. En effet, APC/C dégrade également Skp2, une sous-unité du complexe ubiquitine ligase SCF. L'inactivation de ce complexe ubiquitine ligase va à son tour induire la stabilisation de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} et leur accumulation, conduisant à un arrêt G1 permanent. Cet arrêt en G1 permanent va en fait se traduire par une sénescence qui est appelée Tax-IRS (*Tax-Induced Rapid Senescence*) (Kuo and Giam, 2006). Malgré l'activation prématurée de APC/C, certaines cellules sont capables d'échapper au Tax-IRS et de continuer leur cycle cellulaire. Ces cellules présentent des mutations, notamment dans les gènes codant p21^{Cip1} et p27^{Kip1}

(Liu et al., 2008; Yang et al., 2011). Ainsi, ce mécanisme d'activation prématurée du complexe régulant la mitose pourrait favoriser la multiplication des cellules présentant des mutations des protéines régulatrices du cycle et donc propice à l'apparition d'un phénotype transformé.

4. TAX ET L'APPARITION D'ANOMALIES GENETIQUES DANS LES CELLULES INFECTÉES : UN RÔLE ACTIF

Les anomalies génétiques, que ce soit mutations, insertions, délétions, ou chromosomiques, qu'elles touchent le nombre (aneuploïdie) ou la structure (translocation) des chromosomes sont l'apanage des cellules transformées. Les cellules ATLL ne font pas exception à la règle et très tôt, des anomalies chromosomiques ont été identifiées chez la plupart des patients souffrant d'ATLL ou dans des cellules infectées par HTLV-1 (Chieco-Bianchi et al., 1988; Itoyama et al., 1990; Whang-Peng et al., 1985). Le rôle de Tax dans l'apparition de ces mutations a par la suite été démontré. L'expression de Tax dans des cellules T induit en effet la formation de micronuclei, marques de la présence d'aberrations chromosomiques dans les cellules (Saggiaro et al., 1994). Miyake *et al.* ont rapporté que l'expression de Tax dans des fibroblastes embryonnaires de rat augmentait significativement l'apparition de mutations de façon aléatoire dans le génome cellulaire (Miyake et al., 1999).

a) Tax, une action mutagène directe et indirecte

Tax favorise l'apparition des mutations dans le génome par deux mécanismes principaux. Tax peut induire un stress dans les cellules favorables à l'apparition des anomalies génétiques mais également empêcher la réparation de ces anomalies favorisant la conservation de ces mutations au cours des multiplications cellulaires et leur accumulation, participant ainsi à la transformation des cellules.

(1) TAX, UN GÉNÉRATEUR DE STRESS

Deux types de stress principaux induits par Tax ont été décrits dans les cellules. Le premier a été décrit après l'observation que l'expression de Tax induit un état pro-oxydant dans des cellules de la lignée T Jurkat transfectées qui se traduit par des changements de concentrations intracellulaires en glutathion et en H₂O₂ (Los et al., 1998). Il s'est avéré que l'expression de Tax dans des cellules humaines primaires induisait la production d'espèces

réactives de l'oxygène et donc l'apparition de dommages au niveau de l'ADN et qui en s'accumulant peuvent aller jusqu'à l'induction de la sénescence (Kinjo et al., 2010).

Un autre stress cellulaire induit par Tax et favorable à l'apparition des anomalies génétiques a été très récemment décrit : le stress réplcatif. En effet, Tax en interagissant avec le complexe hélicase MCM2-7 (*Mini Chromosome Maintenance*), modifie le programme spatio-temporel de la réplication en activant des origines de réplication précocement. Cette dérégulation de la réplication est accompagnée de l'apparition de lésions génétiques, notamment des cassures doubles brins marquées par l'accumulation de l'histone γ H2AX phosphorylée dans les cellules (Boxus et al., 2012). Une autre étude avait précédemment mis en avant une déplétion des histones dans la chromatine au fur et à mesure des divisions cellulaires favorisant ainsi l'instabilité génétique. L'expression de Tax seul dans des cellules T Jurkat était suffisante pour induire une réduction de la transcription des gènes d'histones couplée à la réplication, mécanisme qui doit normalement permettre d'incorporer des histones dans l'ADN nouvellement synthétisé (Bogenberger and Laybourn, 2008).

(2) INHIBITION DE LA REPARATION DE L'ADN

Normalement, en cas de d'anomalies génétiques, des machineries de réponse aux dommages de l'ADN sont capables de détecter d'abord puis de réparer ensuite ces anomalies. Plusieurs mécanismes de réparation existent, chacun spécifique d'un certain type de lésions à l'ADN (**Figure 40**). L'activation de la machinerie de réparation est normalement couplée à un arrêt transitoire du cycle cellulaire le temps de la réparation grâce à l'activation des points de contrôle du cycle (**Figure 39**). Si les lésions sont trop importantes, la cellule peut entrer en apoptose, c'est-à-dire une mort cellulaire programmée, pour éviter l'accumulation de mutations qui pourrait aboutir à la transformation des cellules. Cependant, Tax est capable d'inhiber la plupart des mécanismes de réparation de l'ADN favorisant justement l'accumulation des mutations.

Tout d'abord, il a été montré que Tax était capable d'inhiber la réparation de l'ADN par excision de nucléotide, NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Kao and Marriott, 1999). Ce mécanisme permet de réduire les lésions bloquant l'ADN polymérase lors de la réplication, telles que les dimères de pyrimidines par exemple (**Figure 40**). Cette inhibition du NER a par la suite été associée à la capacité de transactiver l'expression de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), une sous-unité du complexe de l'ADN polymérase (Lemoine et al., 2000).

Cependant, ces observations ont depuis été nuancées par une étude montrant un effet opposé de Tax en fonction de sa concentration dans les cellules (Schavinsky-Khrapunsky et al., 2008). A forte concentration, Tax inhibe en effet le mécanisme NER mais à plus faibles concentrations, il l'active (**Figure 40**). Cela semble cohérent avec le fait que les cellules ATLL n'expriment que très peu voire pas de Tax et ce mécanisme pourrait participer à cette sélection en favorisant les cellules qui expriment peu de Tax et donc n'accumulent pas trop de mutations pour éviter la mort cellulaire.

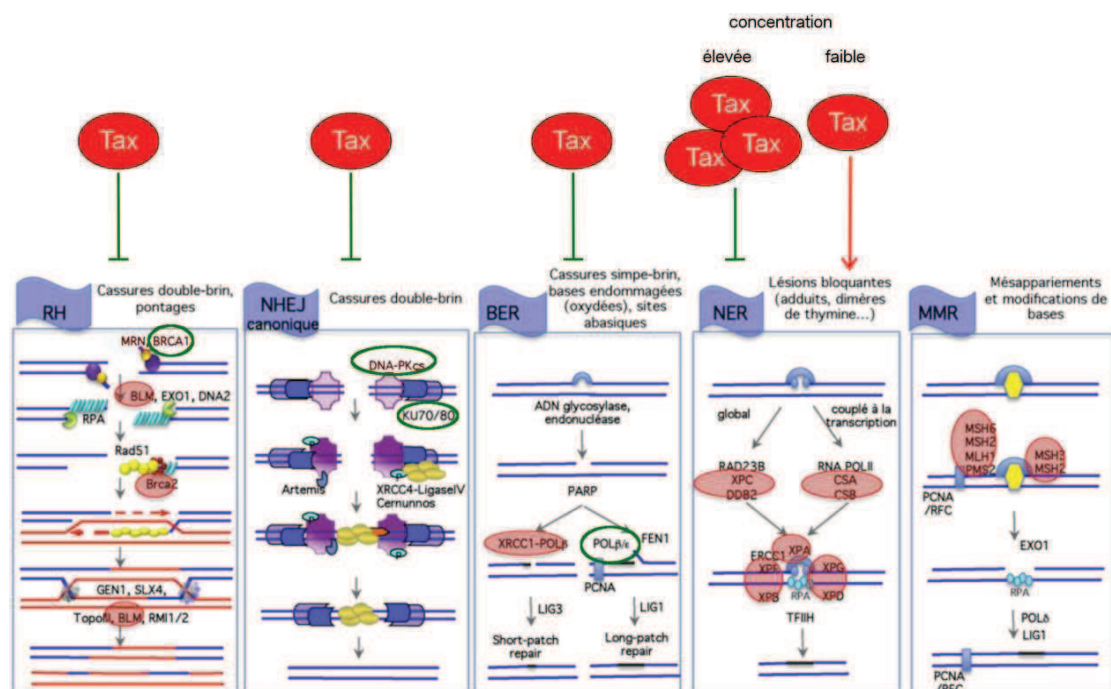


FIGURE 40 : TAX ET INHIBITION DES VOIES DE RÉPARATION DES DOMMAGES À L'ADN

Les différentes voies de réparation associées à chaque type de dommage à l'ADN qui peuvent apparaître dans les cellules sont schématisées. Tax est capable de les inhiber presque toutes. Les protéines ciblées par l'effet inhibiteur sont entourées en vert. L'effet sur la voie de réparation NER dépend de sa concentration. (Les protéines entourées en rouge ont été impliquées dans les processus de cancérogenèse). Adapté de (Rass et al., 2012).

Le mécanisme de réparation par excision de base, BER (*Base Excision Repair*), qui permet la résorption des cassures simple-brin ou des sites abasiques, est également ciblé (**Figure 40**). Tax inhibe notamment l'expression de l'ADN polymérase β (Jeang et al., 1990).

Dans les cellules ATLL, la dérégulation du mécanisme de réparation des mésappariements, MMR, (*Mismatch Repair*) a clairement été mise en évidence. Elle se traduit pas la réduction voire la perte complète de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans le mécanisme, notamment de MSH2 (Morimoto et al., 2005). Cependant, jusqu'à présent, Tax n'a pas été impliqué dans cette inhibition.

Enfin, les dernières anomalies génétiques qui peuvent être réparées sont les cassures double-brin. Pour cela, deux mécanismes existent, la recombinaison homologue (RH) et la religature d'extrémités non homologues, NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) (**Figure 40**). Tax est capable de séquestrer les facteurs qui normalement reconnaissent les cassures double-brin et recrutent ensuite toute la machinerie cellulaire nécessaire à leur résolution. En effet, Tax séquestre dans des foyers nucléaires les facteurs DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*), BRCA-1 (*Breast Cancer-1*) et MDC1 (*Mediator of DNA-damage Checkpoint 1*), facteurs qui ne sont donc pas recrutés au niveau des lésions de l'ADN réelles (Belgnaoui et al., 2010). Deux autres protéines de la voie de réparation NHEJ ont également été identifiées comme étant la cible de Tax pour favoriser l'apparition des anomalies génétiques : Ku80 et DNA-PK. En l'absence de Ku80 en effet, Tax ne semble pas pouvoir induire de micronuclei supplémentaires, synonymes de cassures doubles brins et de réarrangements chromosomiques (Majone et al., 2005). Une autre étude, a confirmé Ku80 comme une cible de Tax et a montré que Tax réprimait l'expression de Ku80, ce qui corrélait à une diminution de la réparation de l'ADN (Ducu et al., 2011). Quant à DNA-PK, il semblerait au contraire que Tax l'active et le stabilise dans des foyers nucléaires, ce qui semble saturer sa capacité de réponse à de nouveaux dommages de l'ADN (Durkin et al., 2008).

En plus d'empêcher la réparation de l'ADN, Tax va également couper les communications entre la machinerie de réparation et le cycle cellulaire, empêchant l'arrêt du cycle nécessaire à la résolution des problèmes. Ainsi, Tax va notamment inhiber le point de contrôle de G2. D'une part, Tax est capable d'interagir avec Chk1 et d'inhiber son activité kinase (**Figure 41**) (Park et al., 2004). D'autre part, Tax va interagir avec Chk2 et induire son oligomérisation et son autophosphorylation et la séquestrer ainsi dans des foyers nucléaires (**Figure 41**) (Gupta et al., 2007; Haoudi et al., 2003). Or la kinase Chk2 est normalement activée après détection de cassures double-brin et bloque la déphosphorylation et l'activation du complexe cycline B-CDK1 et l'entrée en phase M, en inactivant Cdc25 suite à sa phosphorylation (**Figure 40**). De plus, l'activité kinase de Chk2 est inhibée par son interaction avec Tax (Park et al., 2006). En amont de Chk2, Tax inactive également la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et séquestre MDC1 dans des foyers nucléaires différents des foyers de dommages à l'ADN ne permettant pas l'arrêt de la réplication malgré la présence de lésions génétiques, favorisant l'accumulation des mutations (Chandhasin et al., 2008).

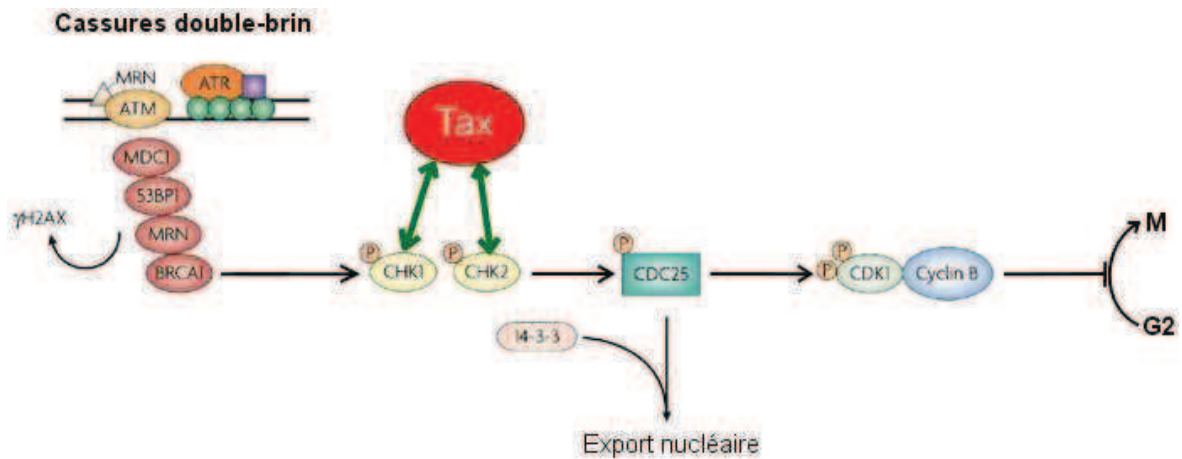


FIGURE 41 : TAX ET LE POINT DE CONTRÔLE G2/M DU CYCLE

En interagissant avec Chk1 et Chk2, Tax bloque leur activité kinase et les empêche d'inactiver Cdc25 pour bloquer l'entrée en phase M même en présence de cassures double-brin. Adapté de (Lobrich and Jeggo, 2007)

b) Induction de l'instabilité chromosomique

Tous les mécanismes ci-dessus, en empêchant la résolution des cassures double-brin, favorisent l'apparition de chromosomes structuellement anormaux. De plus, alors que les cassures double-brin sont normalement protégées et stabilisées par des complexes protéiques, de très nombreuses extrémités 3'-OH sont accessibles et donc non protégées dans les micronuclei en présence de Tax, favorisant les remaniements chromosomiques (Majone and Jeang, 2000). Un dernier mécanisme peut également contribuer à la fusion des chromosomes : le raccourcissement des télomères. Dans les cellules en division, Tax inhibe en effet la télomérase, l'enzyme impliquée dans le maintien des télomères à l'extrémité des chromosomes (Gabet et al., 2003; Hara et al., 2008; Zane et al., 2012). TAL1 (*T-cell acute lymphoblastic leukemia 1*) coopère avec Tax pour réprimer l'expression du gène codant la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT (Terme et al., 2009).

Pour terminer, l'aneuploïdie fréquemment observée dans les cellules exprimant Tax ou les cellules ATLL est associée à des défauts de ségrégation des chromosomes durant la mitose. Alors que cette étape est normalement très régulée, Tax peut perturber la bonne mise en place du fuseau mitotique et induire ainsi des ségrégations anormales. Principalement, alors que le fuseau mitotique normal est constitué de deux centrosomes à chacun des pôles de la cellule, il a été montré que Tax peut induire une duplication anormale des centrosomes. Plusieurs partenaires cellulaires de Tax ont été impliqués dans cet effet. L'interaction de Tax avec RanBP1 au niveau du centrosome favoriserait la fragmentation des

centrosomes et donc l'apparition de centrosomes surnuméraires (Peloponese et al., 2005). L'interaction de Tax avec TAX1BP2 (*Tax1 Binding Protein 2*), une protéine naturellement impliquée dans l'inhibition de la duplication de centrosomes, a également été avancée comme explication à l'aneuploïdie observée (Ching et al., 2006; Pumfery et al., 2006). Enfin l'activation de CDK par Tax a également été associée à l'amplification des centrosomes (Nitta et al., 2006). Les anomalies de formation du fuseau mitotique sont normalement détectées par le point de contrôle du fuseau mitotique qui peut alors arrêter le cycle cellulaire, mais Tax est également capable de contourner ce point de contrôle. Il a été montré que Tax induisait la relocalisation de deux facteurs importants du point de contrôle, hsMAD1 (*Homo sapiens Mitotic Arrest Deficient 1*) et hsMAD2, du noyau vers le cytoplasme (Jin et al., 1998; Kasai et al., 2002). Ainsi, même en présence d'anomalies du fuseau, la mitose va se poursuivre menant le plus souvent à une ségrégation anormale des différents chromosomes.

Tax possède donc un énorme arsenal de moyens à sa disposition pour favoriser l'apparition d'anomalies génétiques et chromosomiques qui lorsqu'elles vont s'accumuler vont pouvoir conduire à l'acquisition d'un phénotype transformé par les cellules et à une capacité à proliférer des cellules même en absence de Tax. Bien sûr, tous les mécanismes décrits ci-dessus ont été identifiés dans de nombreux systèmes cellulaires différents et dans des conditions différentes et il semble évident que tous ces mécanismes ne sont pas actifs en même temps dans une même cellule. Cependant, la redondance des effets de Tax augmente la probabilité d'accumulation des mutations, même si cela peut être au détriment de la survie des cellules (pour revue (Boxus and Willems, 2012)).

5. TAX ET L'APOPTOSE : UN EQUILIBRE A TROUVER

L'apoptose est un mécanisme de défense de la cellule de dernier recours en cas d'infection ou de stress cellulaire trop important. De nombreux virus présentent des stratégies pour bloquer cette apoptose qui permet au cycle de multiplication du virus de se poursuivre. Dans le cas du virus HTLV-1, de telles stratégies existent également et sont d'autant plus importantes que la multiplication du virus est essentiellement clonale et que la mort des cellules infectées signifie la disparition du provirus. De plus, Tax induisant un stress important en dérégulant de très nombreux processus cellulaires, notamment le cycle cellulaire et la réparation des dommages de l'ADN, il est naturel d'observer l'activation de

mécanismes inhibiteurs de l'apoptose dans les cellules infectées par le virus HTLV-1. Là-encore, la protéine Tax joue un rôle très important. Cependant, plus récemment il s'est avéré que les effets de Tax pouvaient être à double tranchant sur le destin des cellules.

a) Tax, protecteur de l'apoptose

De nombreuses études ont démontré que l'expression de Tax protégeait les cellules de l'apoptose en impliquant de très nombreux intermédiaires de la voie de l'apoptose entre son induction et l'activation des caspases effectrices (**Figure 42**). Le principal mécanisme est la capacité de Tax à activer l'expression de toute une batterie de molécules anti-apoptotiques : Bcl-XL (Mori et al., 2001), IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) (Kawakami et al., 1999; Waldele et al., 2006), survivine (Kawakami et al., 2005), c-FLIP (protéine inhibitrice de Flice ou caspase-8) (Krueger et al., 2006), CXCR7 (Jin et al., 2009), Bcl-3 (Saito et al., 2010) (**Figure 42**). Tax a par contre l'effet contraire sur l'expression de Bax, molécule pro-apoptotique (Brauweiler et al., 1997). La quasi-totalité de ces régulations ont montré une dépendance à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B. Pourtant l'importance du facteur CREB dans la protection des cellules à l'apoptose par Tax a également été mise en évidence (Trevisan et al., 2004; Trevisan et al., 2006).

L'apoptose des cellules peut être induite par deux voies : la voie intrinsèque ou mitochondriale, essentiellement activée suite à un stress cellulaire et la voie extrinsèque, activée par la liaison de ligands extracellulaires sur les récepteurs de mort (pour revue (Ola et al., 2011)). A l'exception de c-FLIP qui protège de l'apoptose induite par le récepteur de mort CD95 (Krueger et al., 2006), toutes les autres protéines activées par Tax bloquent essentiellement la voie intrinsèque (**Figure 42**). Une étude a confirmé que Tax protège essentiellement contre la voie intrinsèque de l'apoptose puisque les cellules sont protégées de l'apoptose induite par la carence en facteurs de croissance mais pas contre celle induite par le TNF α (Saggioro et al., 2001).

La voie intrinsèque de l'apoptose est celle qui est déclenchée en cas de stress cellulaire et notamment par le suppresseur de tumeur p53 (**Figure 42**). p53 lorsqu'un stress est détecté, comme par exemple une lésion de l'ADN, va être activé et va en retour moduler l'expression d'un grand nombre de gènes coordonnant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, et l'apoptose. p53 est donc une cible privilégiée de Tax permettant en

[illegible]

L'apoptose peut être induite par les voies extrinsèque, à partir des récepteurs de mort, et intrinsèque, induite notamment par p53 suite à la détection d'un stress dans la cellule comme par exemple les cassures double-brin. Dans la voie intrinsèque, les protéines pro-apoptotique BAX, BAK, tBID et BIM vont contribuer à la formation de pores dans l'enveloppe mitochondriale et à l'ouverture du PTPC (*Pore-Transition Permeability Complex*) induisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) et le relargage du cytochrome c. Les voies extrinsèque et intrinsèque aboutissent à l'activation des caspases effectrices et à la fragmentation de l'ADN par différents effecteurs. La protéine Tax peut activer l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques dont ceux codant pour les protéines marquées d'une étoile rouge. Surtout Tax inhibe l'expression induite par p53 et bloque ainsi l'initiation de la voie intrinsèque. Adapté de <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=99>.

130

quantité limitée dans les cellules. Or il a été montré que Tax inhibe l'interaction de p53 et CBP *in vitro* (Ariumi et al., 2000). Le deuxième mécanisme implique l'interaction du facteur NF- κ B p65 avec p53 phosphorylé sur ses promoteurs cibles alors inactifs (Jeong et al., 2004). Tax induit cette interaction en activant IKK β qui va ensuite phosphoryler p65 et permettre son interaction avec p53 (Jeong et al., 2005b). Ce mécanisme induit donc une stabilisation et une inactivation de p53.

Grâce à ces différentes propriétés, Tax peut contrecarrer les derniers mécanismes de défense contre l'accumulation des anomalies génétiques et favoriser la survie et la prolifération des cellules. Cependant, ces propriétés anti-apoptotiques de Tax ne suffisent pas toujours.

b) La face cachée de Tax : l'induction de la mort cellulaire

Nous avons déjà décrit ci-dessus le phénomène de sénescence observé rapidement suite à l'expression de Tax dans les cellules (Tax-IRS). Ce phénomène a été lié à une hyper-activation de la voie NF- κ B (Ho et al., 2012; Zhi et al., 2011). De plus, alors que de nombreuses études ont décrit les propriétés anti-apoptotique de Tax, d'autres études tout aussi nombreuses ont montré le contraire (Chlichlia et al., 1995; Hall et al., 1998; Los et al., 1998; Nicot and Harrod, 2000; Yamada et al., 1994). Plusieurs études ont notamment décrit un rôle de sensibilisation à l'apoptose induite non par Tax directement mais par d'autres agents de dommages à l'ADN (Haoudi and Semmes, 2003; Kao et al., 2000; Mihaylova et al., 2008). Le rôle de p53 dans cette induction est par contre contradictoire (Haoudi and Semmes, 2003; Mihaylova et al., 2008). Ainsi, tout comme Tax active l'expression de protéines anti-apoptotiques, Tax peut également activer l'expression de protéines pro-apoptotiques. C'est le cas par exemple de Puma et Noxa, dont l'expression est normalement activée par p53 (Mihaylova et al., 2008). Il a également été montré que Tax pouvait induire l'expression de ligands des récepteurs de mort TRAIL et FasL (Chen et al., 1997; Rivera-Walsh et al., 2001). Ainsi, tout comme les boucles autocrines d'interleukines pourraient induire la prolifération des cellules, des boucles autocrines de ligands de récepteurs de mort pourraient activer l'apoptose des cellules. Cependant, une étude a montré que l'induction de l'apoptose par Tax était indépendante de l'interaction des ligands avec les récepteurs de mort (Chlichlia et al., 1997).

Cet effet pro-apoptotique de Tax semble en contradiction avec l'induction de la prolifération cellulaire également induite par Tax. Cependant, un modèle propose que l'effet dominant de Tax dépende du contexte cellulaire et de la disponibilité en facteur de croissance (Jeang, 2010a). En accord avec ce modèle, il a été montré que l'expression de Tax seul dans des cellules T Jurkat n'induisait pas l'apoptose mais nécessitait en plus l'activation d'une kinase de stress (Kasai and Jeang, 2004). Un autre modèle propose que l'engagement dans le cycle cellulaire ou au contraire dans l'apoptose dépende de la quantité de Tax exprimé dans les cellules. De fortes doses de Tax induiraient une apoptose des cellules alors qu'au contraire de faibles doses de Tax dans les cellules favoriseraient la prolifération cellulaire et la protection de l'apoptose (Chlichlia and Khazaie, 2010). Une étude va dans ce sens puisque Schavinsky-Khrapunsky et al. ont démontré qu'à faible dose, Tax activait l'expression de p53 via la voie NF- κ B et en conséquence stimulait le mécanisme de réparation de l'ADN NER, protégeant probablement les cellules d'une accumulation trop importante et létale de mutations. Au contraire, à forte dose, bien que l'activation de l'expression de p53 soit plus importante, elle ne contrebalance pas son inactivation également induite par Tax. En résulte une inhibition de la réparation de l'ADN par NER (Schavinsky-Khrapunsky et al., 2008).

Cet effet inducteur de la mort cellulaire par Tax semble contradictoire avec son activité activatrice du cycle cellulaire. Cependant, cela pourrait être un système de sécurité pour éliminer d'éventuelles cellules dangereuses du pool de cellules en prolifération (pour revue (Boxus and Willems, 2012)). Il est également possible que cette induction de la mort cellulaire par Tax favorise la prolifération de cellules qui ont accumulé assez de mutations, notamment dans des protéines leur permettant d'échapper à la mort cellulaire. Ces cellules pourront ainsi continuer à proliférer et à accumuler des mutations tout en échappant à la mort de façon indépendante de Tax, comme cela semble être le cas pour les cellules ATLL.

En conclusion, la protéine Tax est capable de favoriser l'apparition de dommages à l'ADN et de contrer en même temps toutes les réponses que le suppresseur de tumeur p53 peut mettre en place en réponse à ces dommages à l'ADN : réparation des dommages, arrêt du cycle cellulaire et apoptose. Tax peut également inhiber directement la protéine p53 même si cet effet semble dépendre de la concentration cellulaire de Tax.

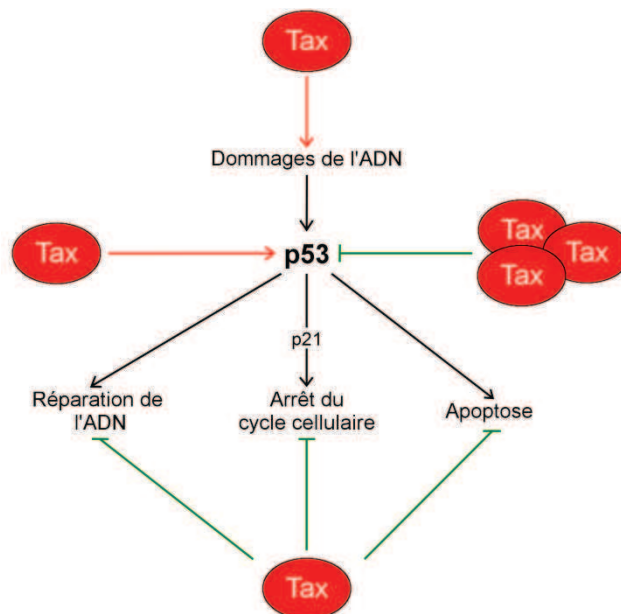


FIGURE 43 : SCHEMA BILAN RECAPITULANT LES PRINCIPAUX EFFETS DE TAX SUR DES PROCESSUS CELLULAIRES POUVANT ABOUTIR A L'IMMORTALISATION DES CELLULES

Les effets activateurs et inhibiteurs de Tax sont représentés respectivement en rouge et en vert.

B. UNE STRUCTURE ET UNE LOCALISATION SUBCELLULAIRE ADAPTEES AUX FONCTIONS MULTIPLES DE LA PROTEINE

Pour remplir toutes ses fonctions, Tax cible un nombre impressionnant de protéines qu'elles soient nucléaires ou cytoplasmiques. Les déterminants de Tax impliqués dans toutes ces interactions ont été très étudiés. Le premier critère de régulation des interactions de Tax avec ses différents partenaires est sa disponibilité dans les deux compartiments cellulaires : cytoplasme et noyau. Cependant Tax n'est pas présent n'importe où dans ces compartiments mais dans des structures bien identifiées.

1. UNE LOCALISATION BIEN CARACTERISTIQUE EN FOYERS

Les premières observations de Tax dans les cellules et les premières études fonctionnelles de Tax, identifié comme un activateur transcriptionnel, ont attribué à Tax une localisation essentiellement nucléaire (Semmes and Jeang, 1996). Cependant, d'autres études ont par la suite démontré qu'une partie des fonctions de Tax et notamment l'activation de NF- κ B nécessitaient sa localisation dans le cytoplasme (Nicot et al., 1998). Dans tous les cas, les protéines Tax ne sont pas présentes de façon homogène dans ces compartiments nucléaires et cytoplasmiques mais s'organisent en sous-structures importantes pour leurs fonctions (pour revue (Lodewick et al., 2011)).

a) Des foyers nucléaires : les corps nucléaires

Semmes et Jeang ont décrit pour la première fois la répartition particulière de Tax dans le noyau de cellules exprimant cette protéine. L'utilisation de l'immunofluorescence et de la microscopie confocale a en effet révélé un marquage de Tax absent du nucléole et sous forme de tâches dans le reste du noyau (**Figure 44**) (Semmes and Jeang, 1996). Ces concentrations de Tax dans le noyau ont alors été appelées *Tax-speckled structures* (TSS).

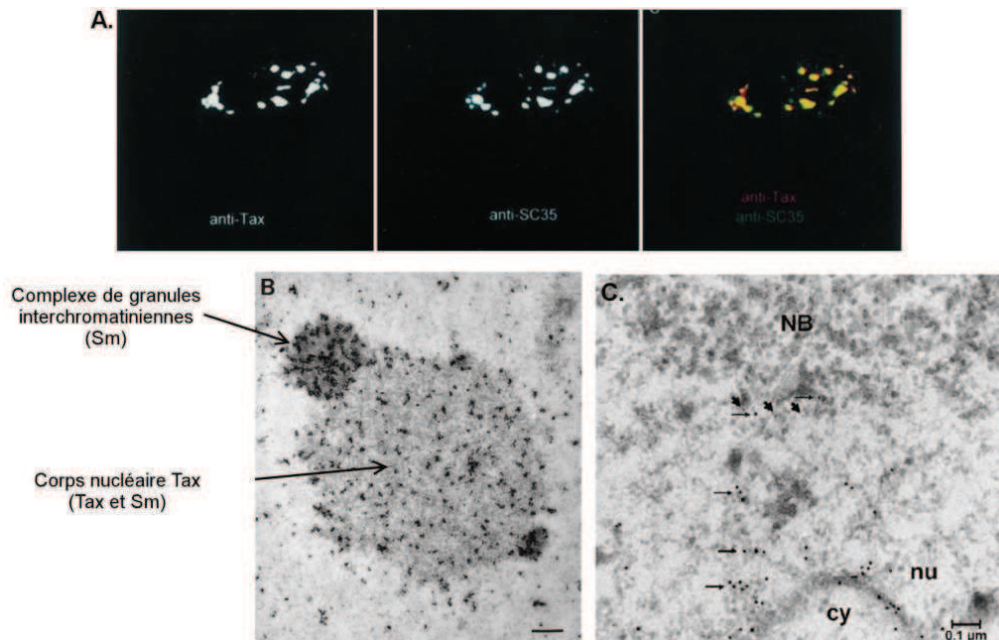


FIGURE 44 : LES CORPS NUCLEAIRES TAX

A. Tax forme des tâches dans le noyau qui co-localisent avec les corps SC-35. Les cellules HeLa exprimant Tax sont immunomarquées avec des anticorps anti-Tax et anti-SC-35. D'après (Semmes and Jeang, 1996).

B. Corps nucléaire Tax central associé à des complexes de granules interchromatinienues périphériques. Les cellules BHK21 transduites par un vecteur codant la protéine Tax sont fixées au paraformaldéhyde et glutaraldéhyde puis incluses dans une résine Lowicryl. Les coupes ultrafines sont ensuite immunomarquées avant observation en microscopie électronique. La protéine Tax est marquée par des petites billes d'or (10 nm) couplées à un anticorps anti-Tax et n'est présente que dans le corps central. Le facteur d'épissage Sm, marqué avec des billes de plus grande taille (20 nm), est également présent dans les corps Tax mais également de façon concentrée dans les corps denses périphériques. La barre d'échelle représente 0,5μm. Adapté de (Bex et al., 1997).

C. La chromatine est observée en périphérie des corps nucléaires Tax. Des cellules BHK21 transduites sont préparées pour l'observation en microscopie électronique avec un immunomarcage anti-Tax (petites billes d'or 5 nm pointées par les flèches épaisses) et un marquage de l'ADN avec la technique TdT (particule d'or 15 nm pointées par les flèches fines). L'ADN n'est pas présent dans le corps nucléaire Tax (NB) mais Tax peut être très proche de l'ADN en périphérie du corps nucléaire. nu : noyau, cy : cytoplasme. D'après (Baydoun et al., 2007).

De nombreux sous-domaines tels que les TSS existent physiologiquement dans le noyau. L'espace interchromatinien est organisé en un réseau de corps nucléaires différents qui compartimentent l'espace (**Figure 45**). Une dizaine de corps nucléaires différents ont été identifiés à ce jour, chacun avec des caractéristiques morphologiques, des composants et

des fonctions qui lui sont propres (pour revue (Mao et al., 2011)). L'absence de membrane autour de ces sous-domaines nucléaires, contrairement aux organelles cytoplasmiques, facilite les échanges avec le nucléoplasme. Les corps nucléaires sont donc des structures dynamiques qui sont à l'équilibre grâce à des mécanismes actifs de maintenance.

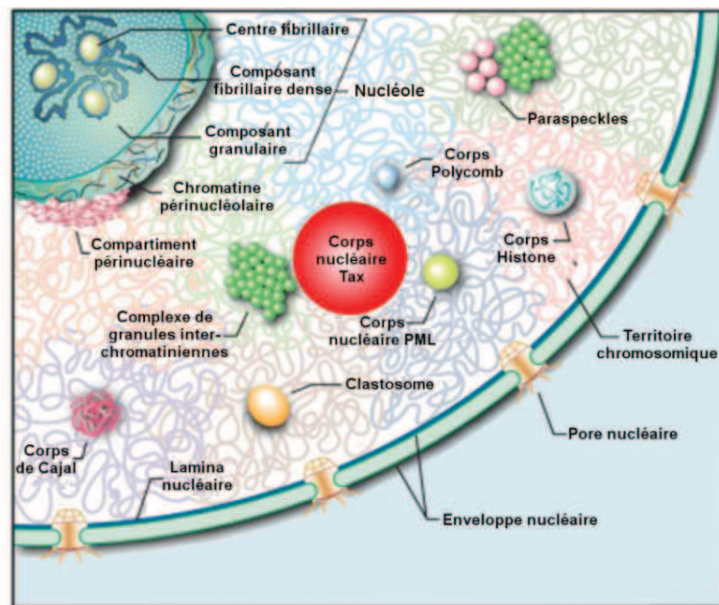


FIGURE 45 : DIVERSITE DES CORPS NUCLEAIRES CELLULAIRES

Représentation du noyau cellulaire en interphase. Les chromosomes occupent des territoires chromosomiques distincts mais qui peuvent avoir des contacts et s'entremêler avec des territoires voisins. L'espace interchromatinien est très organisé et très dynamique, contenant de nombreux corps nucléaires. Dans les cellules exprimant Tax, à ces corps nucléaires cellulaires, se rajoutent les corps nucléaires Tax, distincts des autres corps nucléaires cellulaires, mais très proches de certains d'entre eux, notamment les complexes de granules interchromatiniennes et les corps nucléaires PML. Adapté de (Mao et al., 2011).

Outre Tax, des protéines cellulaires ont été localisées dans ces TSS et notamment le facteur d'épissage SC-35. Or ce facteur d'épissage avait été précédemment décrit comme caractéristique d'un autre type de sous-domaine nucléaire : les clusters de granules interchromatiniennes (IGC, *Interchromatin granule clusters* ou *nuclear speckles*) (Spector and Lamond, 2011). Les TSS ont donc d'abord été assimilés aux IGC. Cependant, la caractérisation en microscopie électronique a permis de les définir comme des corps nucléaires à part entière. Les coupes ultrafines de cellules BHK21 exprimant Tax associées à un immunomarquage par particules d'or ont en effet permis de mettre en évidence l'ultrastructure des corps nucléaires Tax (Bex et al., 1997). Ce sont des sphères de 2 à 4 µm de diamètre composées de granules et de fibrilles. Des corps denses d'environ 1 µm de diamètre sont adjacents à ces corps centraux (**Figure 44**). La forte concentration en protéine Sm, protéines formant les particules ribonucléoprotéiques du complexe d'épissage, dans ces

corps denses et leur taille permet de les assimiler à des complexes de granules interchromatiniennes. La forte proximité entre les corps nucléaires Tax et les granules interchromatiniennes ne permet pas de les distinguer en microscopie optique, ce qui explique en partie la colocalisation observée dans la première étude entre SC-35 et les corps nucléaires Tax. Cependant, la microscopie électronique a permis de mettre en évidence la présence de protéines de la machinerie d'épissage (les protéines Sm) également au sein des corps nucléaires Tax bien que dans une concentration plus faible que dans les corps denses périphériques (**Figure 44**). De plus, la présence de SC-35 dans les corps nucléaires Tax est également fortement suggérée par la mise en évidence d'une interaction directe entre Tax et SC-35 par co-immunoprécipitation (Semmes and Jeang, 1996).

De nombreuses études, essentiellement menées dans des cellules adhérentes transfectées ont permis d'allonger la liste des composants des corps nucléaires Tax. Associée à la présence des facteurs d'épissage Sm et SC-35, des éléments de la machinerie de transcription ont été mis en évidence dans les corps nucléaires Tax : ARN polymérase II dont sa forme hyperphosphorylée sur le domaine C-terminal, synonyme d'élongation de la transcription, ainsi qu'une des kinases impliquée dans sa phosphorylation, CDK8, et des facteurs et cofacteurs de transcription TBP, CBP et p300, p50 et RelA, et CREB (Baydoun et al., 2007; Bex et al., 1997; Bex et al., 1998; Semmes and Jeang, 1996). Des ARN néo-synthétisés ont également été mis en évidence dans ces corps nucléaires grâce à l'incorporation de BrdU ou d'UTP conjugué à un fluorochrome (Baydoun et al., 2007; Semmes and Jeang, 1996). Toutes ces observations suggèrent fortement que les corps nucléaires Tax sont des structures de transcription active. Pourtant, l'ADN n'est pas présent au sein de ces structures. La microscopie confocale a apporté une solution à cette apparente contradiction : la chromatine est détectée juste en périphérie des corps nucléaires et l'ADN et Tax sont donc très proches l'un de l'autre à la frontière des corps nucléaires (**Figure 44**) (Baydoun et al., 2007). La présence dans les corps nucléaires Tax des facteurs p50 et RelA d'une part et CREB d'autre part laisse supposer que ces structures sont le siège de l'activation par Tax de la transcription NF- κ B et CREB, respectivement. L'idée de la transactivation des promoteurs à éléments de réponse κ B par Tax au sein des corps nucléaires a été renforcée par la détection d'un autre membre de la voie NF- κ B, NEMO/IKK γ , et surtout d'ARNm spécifiques d'un gène sous contrôle d'un tel promoteur par hybridation *in situ* justement dans les corps nucléaires Tax (Bex et al., 1997; Kfoury et al., 2011; Lamsoul

et al., 2005). Au contraire, Semmes et Jeang avaient précédemment montré que la formation des corps nucléaires Tax était observée en présence de mutants de Tax qui avaient conservés leur capacité à activer la voie CREB/ATF mais pas en présence de mutants de Tax qui étaient capables d'activer la voie NF- κ B mais incapables d'activer la voie CREB/ATF suggérant plutôt un lien entre corps nucléaires Tax et activation de la transcription via CREB (Semmes and Jeang, 1996). Une autre étude a en l'occurrence mis en évidence la localisation de tels mutants actifs pour la transactivation NF- κ B ou CREB seulement dans des corps nucléaires distincts et en présence de différents co-activateurs p300 ou CBP, respectivement (Bex et al., 1998). Ainsi, les corps nucléaires Tax semblent être des sites privilégiés de transcription, notamment induite par Tax. Cependant, la transactivation des promoteurs par Tax n'est pas limitée à ces structures puisque leur déstructuration suite à un choc thermique n'empêche pas Tax d'activer la transcription d'un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur répondant à CREB ou du gène *c-fos* (Semmes and Jeang, 1996).

En dehors des machineries de transcription et d'épissage, d'autres composants ont été identifiés dans les corps nucléaires Tax et notamment de nombreuses protéines de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN : DNA-PK, BRCA1, MDC1, Chk2 et 53BP1 (Belgnaoui et al., 2010; Durkin et al., 2008; Gupta et al., 2007). Or l'absence de Nbs1, marqueur classique des foyers de réparation, au sein des corps nucléaires suggère un rôle de séquestration de la machinerie de réparation au sein des corps nucléaires Tax pour éviter le recrutement des facteurs au niveau des vrais foyers de réparation où se situent les lésions de l'ADN (Belgnaoui et al., 2010).

Très récemment, des éléments de la machinerie de réplication, les hélicases MCM2-7, ont également été mises en évidence dans les corps nucléaires qui sont d'ailleurs localisés à proximité des origines de réplication du génome cellulaire (Boxus et al., 2012). Les corps nucléaires pourraient donc avoir un rôle dans la réplication de l'ADN.

Enfin, des composants de la machinerie de SUMOylation, l'enzyme de conjugaison Ubc9 et SUMO1 (*Small Ubiquitin-like Modifier 1*), ont été récemment mis en évidence dans les corps nucléaires Tax, leur associant un rôle de SUMOylation (Kfoury et al., 2011).

Les corps nucléaires Tax ne sont pas seuls dans le noyau des cellules mais sont plus probablement intégrés au sein du réseau des corps nucléaires existant naturellement dans les cellules (**Figure 45**). Ainsi des échanges entre les corps nucléaires Tax et d'autres corps nucléaires semblent exister. Tout d'abord, la présence, au sein des corps nucléaires Tax, des

facteurs d'épissages Sm et SC-35, constituants essentiels des granules d'interchromatine justement juxtaposés aux corps nucléaires Tax laisse supposer un recrutement des facteurs d'épissages à partir de ces granules (Lodewick et al., 2011). De plus, d'autres corps nucléaires ont également été identifiés à proximité immédiate des corps nucléaires Tax. La présence de foyer contenant à la fois Rex et CRM1, facteur d'export nucléaire et partenaire connu de Rex dans l'export des ARNm, à la périphérie des corps nucléaires Tax suggère une coopération de Tax, activateur de la transcription de gènes présents à la périphérie des corps nucléaires Tax, et de Rex-CRM1 pour prendre en charge les ARNm néo-synthétisés et les exporter dans le cytoplasme (Baydoun et al., 2007). Les corps nucléaires PML (*Promyelocytic Leukemia protein*) sont également présents à proximité des corps nucléaires Tax (Bex et al., 1997). Or PML, la protéine organisatrice de ces corps a une fonction co-activatrice de la transcription du LTR proviral par Tax même si cette fonction ne semble pas dépendre de la formation des corps PML (Ariumi et al., 2003). Cette fonction co-activatrice de PML est renforcée en présence de CBP ou p300. Or CBP est un composant des corps PML mais en présence de Tax, CBP disparaît des corps nucléaires PML alors qu'il s'accumule au contraire dans les corps nucléaires Tax (Lodewick et al., 2011). Ces observations laissent penser que Tax pourrait recruter CBP/p300, co-activateur essentiel de ses fonctions transactivatrices, à partir des corps PML. Une autre étude a également décrit la relocalisation d'un co-activateur de Tax, SMRT, dans les corps nucléaires Tax alors que cette protéine est normalement présente dans des petits corps nucléaires MAD (*Matrix-Associated Deacetylase*) (Ariumi et al., 2003).

Dans le noyau, Tax se concentre donc dans des sous-domaines nucléaires bien organisés : les corps nucléaires Tax. Ces corps nucléaires sont le siège d'une partie des fonctions de Tax, notamment grâce à la concentration de nombreux partenaires cellulaires requis pour la réalisation de ces fonctions. Ces structures sont en équilibre dynamique et sont favorables aux échanges avec d'autres corps nucléaires naturellement présents dans le noyau des cellules mais aussi probablement avec le nucléoplasme où Tax est également détecté.

b) Des agrégats cytoplasmiques

Contrairement à la localisation de Tax dans les corps nucléaires, la localisation de Tax dans le cytoplasme fait l'objet de plus de débats. En effet, Tax est détecté de manière diffuse

mais également concentré dans des sous-domaines du cytoplasme essentiellement en périphérie du noyau. L'absence de vimentine de ces structures laisse supposer que ce ne sont pas des agrésomes formés à cause de la surexpression de Tax dans les cellules (Lamsoul et al., 2005). Cependant plusieurs sous-structures cytoplasmiques ont été décrites. D'une part, la présence de Tax dans des granules distribuées à travers tout le cytoplasme mais particulièrement concentrée en périphérie du noyau a été liée à son interaction avec la calréticuline qui retiendrait Tax dans le cytoplasme (Alefantis et al., 2007) (**Figure 46A**). Comme dans les corps nucléaires, d'autres partenaires fonctionnels de Tax ont également été décrits dans ces structures, notamment des membres de la voie NF- κ B, TAB2, IKK γ /NEMO et TAX1BP1 (Avesani et al., 2010). D'autre part, des agrégats périnucléaires, associés à l'appareil de Golgi et au centrosome, ont été impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B permettant le recrutement par Tax du complexe IKK et d'autres protéines de la voie de signalisation NF- κ B formant ainsi une plate-forme de signalisation efficace pour l'activation de la voie. Nejmeddine *et al.* ont montré une colocalisation de Tax à la fois avec GM130, un marqueur de l'appareil de Golgi, et avec la tubuline- β , au niveau du centre organisateur des microtubules, en périphérie du noyau dans des cellules de patients infectés par HTLV-1 (**Figure 46B**) (Nejmeddine et al., 2005). Le recrutement du complexe IKK par Tax a également été observé au niveau de ces structures (**Figure 46C et D**) (Harhaj et al., 2007; Kfoury et al., 2008). Au niveau de l'appareil de Golgi, un fractionnement a permis de préciser la localisation de Tax dans les radeaux lipidiques des membranes de cet organite, comme en atteste sa présence dans les fractions marquées par LAT et GM1 (Huang et al., 2009). Ces structures cytoplasmiques où se concentre Tax ont surtout été étudiées pour leur rôle dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Cependant, comme dans le cas des corps nucléaires et de la machinerie de réparation de l'ADN, Tax peut séquestrer des protéines dans ces structures. C'est le cas de hTid et Hsp70, deux protéines formant un complexe chaperonnant des protéines suppresseur de tumeur et régulant des processus cellulaires tels que l'apoptose (Cheng et al., 2001). C'est également le cas de hScrib, une protéine à domaine PDZ formant normalement un complexe avec le suppresseur de tumeur hDlg (Arpin-Andre and Mesnard, 2007).

Pour décrire complètement la localisation de Tax, il faut préciser que Tax est également détecté dans le milieu extracellulaire et notamment dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de TSP-HAM. En effet, la protéine Tax peut être sécrétée

comme cela a été démontré *in vitro* (Alefantis et al., 2005). L'interaction de Tax avec de nombreuses protéines impliquées dans les différentes étapes de la voie de sécrétion permet de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent à la sécrétion de Tax (Jain et al., 2007).

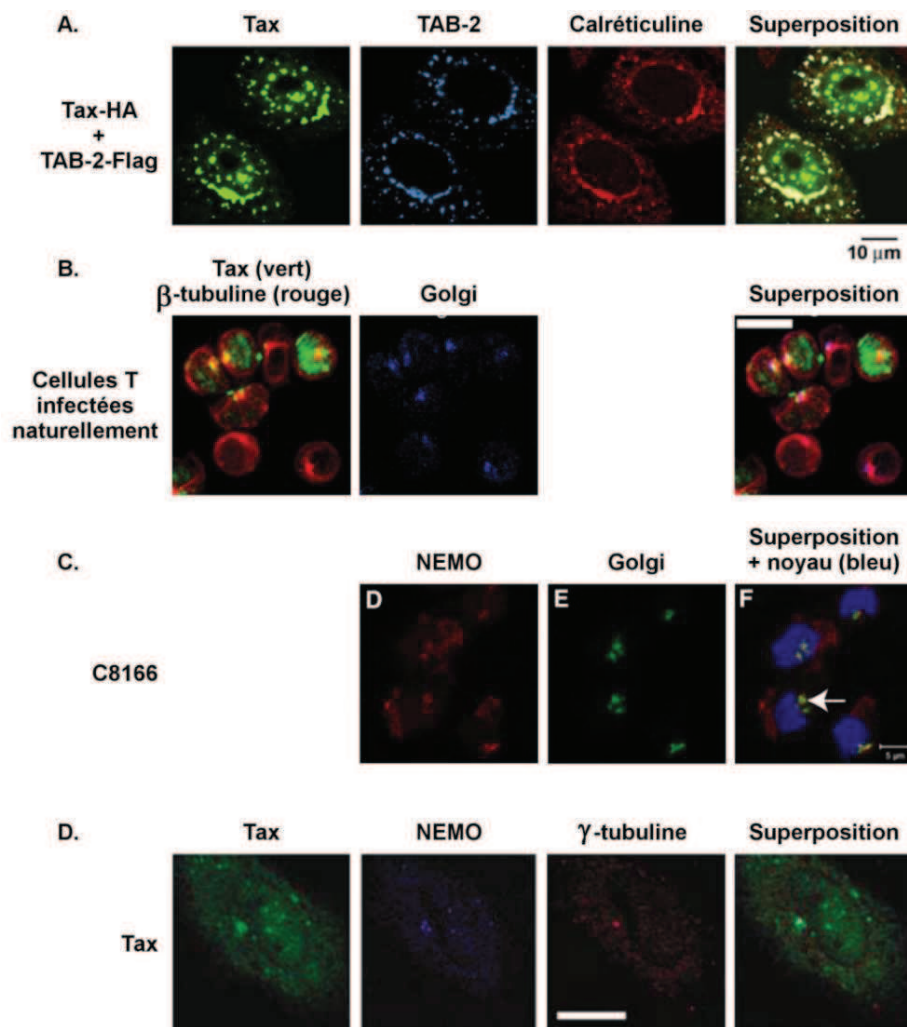


FIGURE 46 : TAX DANS DIFFERENTS AGREGATS CYTOPLASMIQUES

A. Tax est présent dans des granules cytoplasmiques contenant la calréticuline et TAB-2. Ces granules sont plus concentrées autour du noyau. Des cellules Hep2 co-transfectées avec des plasmides codant Tax avec une étiquette HA et TAB-2 avec une étiquette Flag. Les cellules fixées sont marquées avec des anticorps anti-HA (vert), anti-Flag (bleu) et anti-calréticuline (rouge). Adapté de (Avesani et al., 2010).

B. Tax co-localise à la fois avec le centrosome et avec le Golgi dans des cellules T naturellement infectées. Des PBMC de patients séropositifs pour HTLV-1 ou souffrant d'HAM/TSP sont fixées et marquées avec des anticorps anti-Tax (vert), anti-β-tubuline (rouge) et anti-GM130 (bleu). Barre d'échelle : 10 µm. Adapté de (Nejmeddine et al., 2005).

C. En présence de Tax, NEMO est recruté au niveau du Golgi. Des cellules C8166 sont marquées avec des anticorps anti-NEMO (rouge) et anti-GM130 (vert). Le noyau est marqué en bleu. La flèche pointe une colocalisation entre NEMO et l'appareil de Golgi. Adapté de (Harhaj et al., 2007)

D. Tax recrute NEMO au niveau du centrosome. Des cellules HeLa transfectées avec un vecteur codant Tax sont fixées et marquées avec des anticorps anti-Tax (vert), anti-NEMO (bleu) et anti-γ-tubuline (rouge) marquant le centrosome. Barre d'échelle : 10 µm. D'après (Kfoury et al., 2008)

La localisation subcellulaire de Tax, telle que décrite ci-dessus, n'est cependant pas figée et Tax reste une protéine qui peut circuler dans la cellule.

c) Tax, une protéine dynamique

L'observation en microscopie sur cellules fixées ne permet pas de savoir si les différentes localisations observées sont le fruit de populations de Tax bien distinctes et figées ou si une même protéine Tax peut passer par les différentes structures subcellulaires. Une première étude a permis de montrer que les protéines Tax pouvaient circuler entre le noyau et le cytoplasme. En effet, suite à la formation d'un hétérokaryon entre une cellule exprimant Tax et une cellule n'exprimant pas Tax, Tax se retrouve dans le noyau de la cellule négative au départ, démontrant le passage de Tax du cytoplasme vers le noyau (Burton et al., 2000). Grâce à la fusion de Tax à un fluorochrome photoconvertible, il a été possible de suivre une petite population de Tax et de confirmer la capacité de Tax à passer du cytoplasme au noyau mais également de démontrer le mouvement inverse de Tax du noyau vers le cytoplasme et la circulation de Tax entre les corps nucléaires (Kfoury et al., 2011).

Le passage de Tax du cytoplasme au noyau et inversement nécessite le passage par le pore nucléaire et il a été montré que ce passage était énergie et transporteur indépendant (Tsuji et al., 2007). Tax peut même endosser le rôle de transporteur pour l'import nucléaire de certaines protéines cellulaires, comme p65. L'indépendance vis-à-vis de la machinerie d'export nucléaire et notamment de CRM1 avait déjà été démontrée même si le signal d'export nucléaire de Tax fusionné à la GFP facilite l'export de cette protéine grâce à CRM1 (Alefantis et al., 2003).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la répartition de Tax entre cytoplasme et noyau. Le stress génotoxique, tout d'abord, favorise l'export nucléaire de Tax (Gatza and Marriott, 2006). Il est à noter que dans ce cas, l'exportine CRM1 semble impliquer dans l'export Tax. Des protéines cellulaires influencent également la localisation de Tax. Ainsi la co-transfection de SMYD3, une histone méthyltransférase qui interagit avec Tax, et de Tax modifie la localisation de Tax en faveur d'une localisation cytoplasmique (Yamamoto et al., 2011). La déubiquitine STAMBPL1 (*STAM-Binding Protein-Like 1*) favorise également l'export nucléaire de Tax et est notamment requis lors de l'export de Tax en réponse au stress génotoxique décrit précédemment (Lavorgna and Harhaj, 2012).

La présence de Tax à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau facilite son interaction avec de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans des processus cellulaires divers et variés. Cependant, cela implique également que la protéine Tax soit capable d'établir de multiples interactions protéine-protéine.

2. TAX, UNE PROTEINE MULTI-DOMAINES PEU STRUCTUREE

Tax est une protéine de 353 acides aminés pour un poids moléculaire apparent de 40 kDa. Le nombre impressionnant de partenaires décrits pour la protéine Tax soulève la question de l'accessibilité de Tax vis-à-vis de toutes ces protéines cellulaires. L'analyse de la séquence et de la structure de Tax permet en partie de répondre à la question (pour revue (Kfoury et al., 2012)).

La présence de Tax dans des structures subcellulaires différentes est une des stratégies permettant l'interaction de Tax avec des partenaires différents. La séquence de Tax comporte les signaux nécessaires à ces différentes localisations (**Figure 47**). Un signal de localisation nucléaire (NLS) dans les 50 premiers acides aminés et un signal d'export nucléaire (NES) riche en leucines entre les acides aminés 188 à 202 permettent à la protéine Tax de circuler entre le cytoplasme et le noyau (Gitlin et al., 1991; Smith and Greene, 1992). Cependant, le NES semble naturellement masqué au sein de la protéine, requérant des interactions ou des modifications de Tax pour l'exposer (Alefantis et al., 2003). Une séquence supplémentaire, indépendante du NLS, qui permet d'envoyer spécifiquement Tax dans les corps nucléaires, TSLS (*Tax Speckled structure Localization Signal*) a également été identifiée entre les acides aminés 50 et 75 (Fryrear et al., 2009).

La formation de dimères de Tax est également importante pour la fonction et la localisation de Tax. En effet, des protéines incapables de se dimériser se localisent uniquement dans le cytoplasme (Fryrear et al., 2009). Le domaine de dimérisation de Tax a été localisé dans la partie centrale de Tax et découpé en 3 sous-domaines : DD1 (aa 127-146), DD2 (181-194) et DD3 (213-228) (Basbous et al., 2003; Fryrear et al., 2009; Tie et al., 1996) (**Figure 47**). Une structure en doigt de zinc située entre les acides aminés 22 et 53 a également été impliquée dans les capacités de dimérisation de Tax (Jin and Jeang, 1997; Semmes and Jeang, 1992a) (**Figure 47**). Or la formation de dimères peut permettre à Tax d'augmenter ses surfaces d'interaction potentielles avec des partenaires cellulaires. La formation de dimère est également essentielle pour la réalisation des fonctions transactivatrices de Tax de façon optimale (Jin and Jeang, 1997; Tie et al., 1996).

Enfin, une dernière caractéristique structurale de Tax peut expliquer en partie sa capacité à interagir avec de si nombreux partenaires. En effet, malgré de nombreuses tentatives, la structure cristallographique 3D de la protéine Tax n'a pas été élucidée. Ceci est

très probablement dû aux nombreuses régions intrinsèquement désordonnées prédites dans Tax et corrélé à la présence de nombreux résidus proline, sérine et glycine favorisant le désordre au sein des protéines (Boxus et al., 2008). Or une protéine intrinsèquement désordonnée est dotée d'une flexibilité conformationnelle plus importante qui lui permet notamment d'interagir avec de nombreux partenaires.

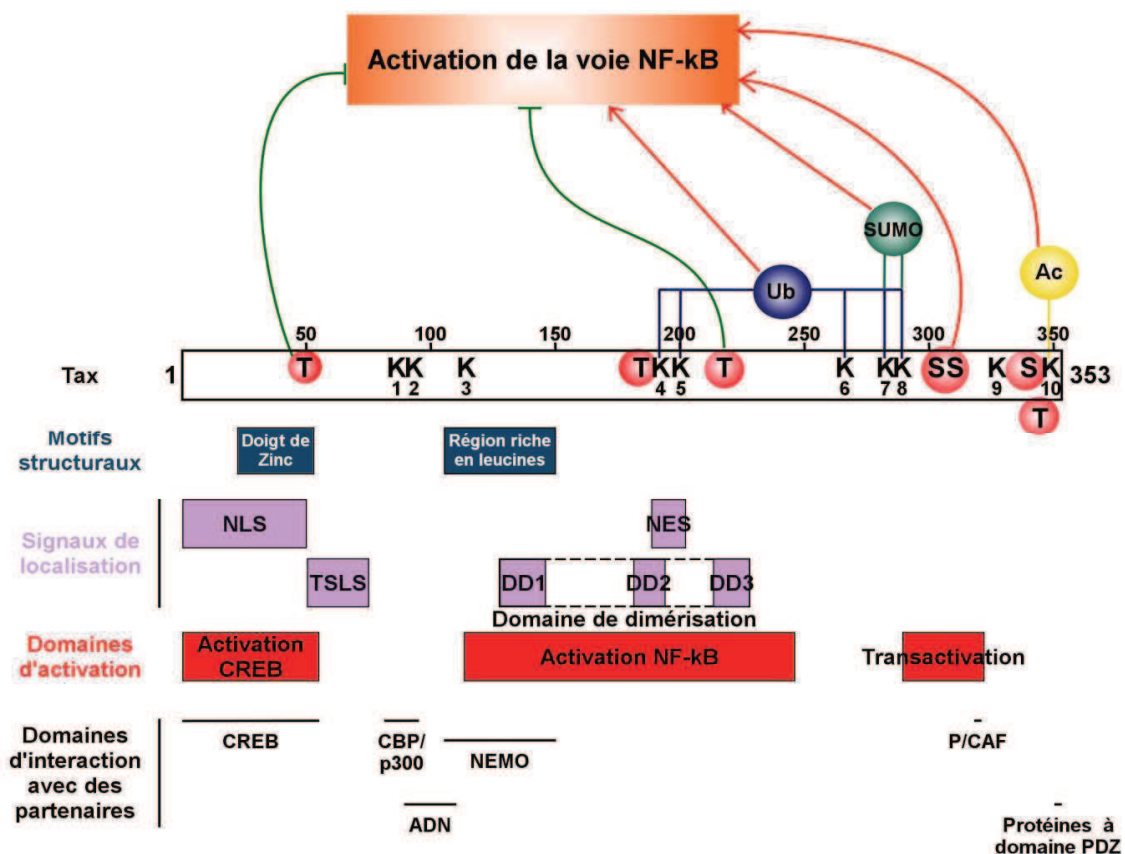


FIGURE 47 : SCHEMA DE LA STRUCTURE ET DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TAX

Même si la protéine Tax est peu structurée, un motif en doigt de zinc et une région riche en leucines ont été identifiés dans la séquence de Tax. Grâce à l'étude de nombreux mutants, les principaux domaines fonctionnels de Tax ont également été délimités souvent en lien avec la capacité de Tax d'interagir avec certains partenaires cellulaires. La localisation dynamique de Tax dans la cellule repose sur la présence de signaux de localisation dans sa séquence : signal de localisation nucléaire (NLS), signal de localisation dans les corps nucléaires (TSLS) et signal d'export nucléaire (NES). La dimérisation de Tax est également nécessaire à sa localisation. Le domaine de dimérisation a été localisé dans la région centrale de Tax et subdivisé en 3 sous-domaines DD1, DD2 et DD3. Les 10 lysines (K) présentes dans la séquence de Tax sont également représentées avec les modifications post-traductionnelles qui leur sont associées : ubiquitinylation (Ub), SUMOylation (SUMO) et acétylation (Ac). Les résidus sérine (S) et thréonine (T) dont la phosphorylation a été décrite sont représentés entourés de rouge. Ces modifications post-traductionnelles peuvent avoir un effet inhibiteur (trait vert) ou activateur (flèche rouge) sur la capacité de Tax à activer la voie NF-κB.

Bien qu'aucune structure tridimensionnelle de Tax ne soit connue, l'analyse de la séquence de Tax et de nombreux mutants, tels que ceux générés par Smith et Greene ou Semmes et Jeang a permis d'identifier de nombreux domaines fonctionnels au sein de la

protéine (Semmes and Jeang, 1992b; Smith and Greene, 1990). Pour sa fonction de transactivation du promoteur viral notamment, plusieurs domaines de Tax se sont révélés importants (**Figure 47**). La région N-terminale de Tax et notamment la structure en doigt de zinc, est importante pour interagir avec CREB (Goren et al., 1995; Yin et al., 1995). Même si une étude a proposé l'existence de deux motifs différents, un central et un C-terminal, pour l'interaction avec p300 et CBP respectivement (Bex et al., 1998), un seul motif, situé entre les aa 81 et 95 et ressemblant fortement au motif KID permettant à CREB phosphorylé d'interagir avec ces mêmes co-activateurs, a été clairement identifié (Harrod et al., 1998). L'interaction avec P/CAF également recruté au niveau du LTR proviral implique essentiellement les aa 319 et 320 (Jiang et al., 1999). Pour stabiliser le complexe ternaire sur le LTR proviral, Tax contacte l'ADN grâce à un domaine identifié entre les aa 89 et 110 (Kimzey and Dynan, 1998). Enfin un domaine associé à la capacité transactivatrice de Tax a été mis en évidence entre les aa 289 et 322 (Semmes and Jeang, 1995). D'autre part, pour l'activation de la voie NF- κ B un large domaine central de Tax est impliqué, contenant notamment la région riche en leucines permettant l'interaction avec IKK γ /NEMO (Xiao et al., 2000; Yamaoka et al., 1996). Enfin les 4 derniers acides aminés de la protéine Tax, E T E V, ont été reconnus comme étant un motif PBM (*PDZ Binding Motif*) consensus d'interaction avec le domaine PDZ de protéines telles que hDlg, un suppresseur de tumeur (Hirata et al., 2004; Rousset et al., 1998) (**Figure 47**).

Outre la structure de Tax et sa séquence riche en motifs d'interaction bien identifiés ainsi que sa présence à la fois cytoplasmique et nucléaire, la protéine Tax est également la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications, en modifiant la structure ou les motifs d'interaction de Tax peuvent réguler les interactions de Tax avec ses différents partenaires.

C. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES, UNE FINE REGULATION DES NOMBREUSES FONCTIONS DE TAX

La protéine Tax ne contient que 353 acides aminés et pourtant au moins 5 modifications post-traductionnelles différentes pouvant cibler ses résidus ont été décrites. Aujourd'hui, plus d'une centaine de modifications des protéines existent allant de petites modifications chimiques à la conjugaison à des petites protéines, essentiellement de la

famille de l'ubiquitine et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Surtout, il est de plus en plus évident que ces modifications post-traductionnelles ne sont pas toutes indépendantes les unes des autres mais qu'elles forment des combinaisons augmentant encore la complexité et la diversité des fonctions associées à ces modifications (pour revue (Vertegaal, 2011)). La protéine Tax a su tirer avantage de la grande variabilité offerte par ces modifications (**Figure 47**).

1. TAX, UNE PHOSPHOPROTEINE

La première modification de Tax identifiée fut une phosphorylation. Dès 1988, un fractionnement de Tax dans des cellules d'insectes a révélé la présence de Tax phosphorylé dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques (Nyunoya et al., 1988). Une autre étude a décrit la phosphorylation ainsi qu'un rôle stimulateur des esters de phorbol sur cette phosphorylation (Fontes et al., 1993). Ces deux études ont conclu à une phosphorylation de Tax sur des résidus sérine. Mais l'identification précise des résidus impliqués parmi les 26 sérines que compte Tax a nécessité le recours à la mutagenèse dirigée. Semmes et Jeang ont ainsi mis en évidence l'importance des sérines 113, 116 et 258, dans la région centrale de Tax, pour l'activation de la voie NF- κ B, sans étudier cependant le profil de phosphorylation de ces mutants (Semmes and Jeang, 1992b). Finalement les sérines 300 et 301 (S300/301) ont été décrites comme les sites essentiels de phosphorylation de Tax (**Figure 47**). La phosphorylation de Tax sur au moins une de ces deux sérines est nécessaire pour la localisation de Tax dans les corps nucléaires et pour son activation des voies CREB et NF- κ B (Bex et al., 1999). Depuis, d'autres sites de phosphorylation ont été identifiés dans Tax mais avec plutôt un effet inhibiteur sur l'activité de Tax. La phosphorylation de la thréonine 215 semble en effet inhiber l'activation à la fois de la voie CREB et de la voie NF- κ B, alors que la phosphorylation de la thréonine 48 inhibe spécifiquement l'activation de la voie NF- κ B (**Figure 47**) et que la phosphorylation de Thr184 et Ser336 ne semble pas avoir d'effet sur les voies CREB et NF- κ B (Durkin et al., 2006). Une étude semi-quantitative a révélé que ces sites représentaient les formes majeures de Tax phosphorylé dans les cellules alors que la phosphorylation des sérines 300 et 301 était minoritaire. Ainsi, seule une minorité de protéines Tax seraient actives dans les cellules, le reste étant maintenu sous forme phosphorylée inactive. Enfin, l'identification des kinases impliquées dans ces régulations est

importante. Seule une étude a démontré la phosphorylation de Tax par CK2 *in vitro*, mais sur des sites non décrits jusqu'à présent (Ser344 et Thr351) sauf pour la Ser336 (**Figure 47**) (Bidoia et al., 2010).

2. UNE ISOMERISATION DES PROLINES ACTIVATRICE

Tax possède également des formes où certaines de ses prolines sont isomérisées. De plus, une interaction entre Tax et Pin1 (*Peptidyl prolyl cis/trans Isomerase*) a été décrite et cette enzyme responsable de l'isomérisation des prolines est surexprimée dans les lignées HTLV-1 et les cellules ATLL (Jeong et al., 2009; Peloponese et al., 2009). Bien que l'isomérisation des prolines de Tax par Pin1 n'ait pas été clairement démontrée, Pin1 augmente la demi-vie de Tax en inhibant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Jeong et al., 2009). De plus, Pin1 favorise l'activation de la voie NF- κ B par Tax en facilitant son interaction avec IKK γ /NEMO (Peloponese et al., 2009).

A part la phosphorylation et l'isomérisation qui touchent les sérines/thréonines et les prolines de Tax respectivement, les lysines de Tax sont les principales cibles des modifications post-traductionnelles de Tax.

3. LES LYSINES DE TAX, CIBLES DE MULTIPLES MODIFICATIONS ET ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

La protéine Tax compte 10 lysines dans sa séquence. Les 7 lysines de la moitié C-terminales concentrent l'essentiel des modifications (**Figure 47**).

a) Acétylation

La protéine Tax est acétylée sur sa dernière lysine, la lysine 10 (K10) en position 346 (**Figure 47**). L'enzyme responsable de cette modification n'est autre que p300, l'histone acétyltransférase que Tax recrute pour transactiver différents promoteurs (Lodewick et al., 2009). La surexpression de p300 augmente en effet l'acétylation de Tax ainsi que l'expression des gènes sous contrôle d'un promoteur NF- κ B mais uniquement si celui-ci est intégré dans le génome et donc empaqueté dans la chromatine. La phosphorylation de Tax sur S300/301 et la formation des corps nucléaires sont requis pour la bonne acétylation de Tax (Lodewick et al., 2009). Des résultats récents montrent en effet une colocalisation de Tax

acétylé et de p300 dans les corps nucléaires, suggérant que ces derniers sont le site d'acétylation de Tax (Lodewick et al., 2011).

Outre les modifications chimiques décrites ci-dessus, Tax peut également être conjugué à de petites protéines : les protéines de la famille de l'ubiquitine. Une seule de ces petites protéines est capable de générer un nombre très important de modifications pour influencer de façon multiple les propriétés de Tax.

b) Ubiquitylation

(1) L'UBIQUITINE ET SA CONJUGAISON AUX PROTEINES

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés et 8kDa, identifiée dans le milieu des années 1970 et très conservée de la levure à l'Homme. Depuis de nombreuses autres petites protéines avec les mêmes propriétés, appelées protéines *Ubiquitin-like* (Ubl) ont été découvertes. Bien qu'elles n'aient pas forcément une grande similarité de séquence avec l'ubiquitine, elles partagent toutes une structure tridimensionnelle commune avec l'ubiquitine (*β -grasp fold*) (**Figure 48A**). De plus, tous les Ubl ont, comme l'ubiquitine, la caractéristique d'être conjugués de façon covalente à d'autres protéines grâce à des mécanismes proches (pour revue (Kerscher et al., 2006)).

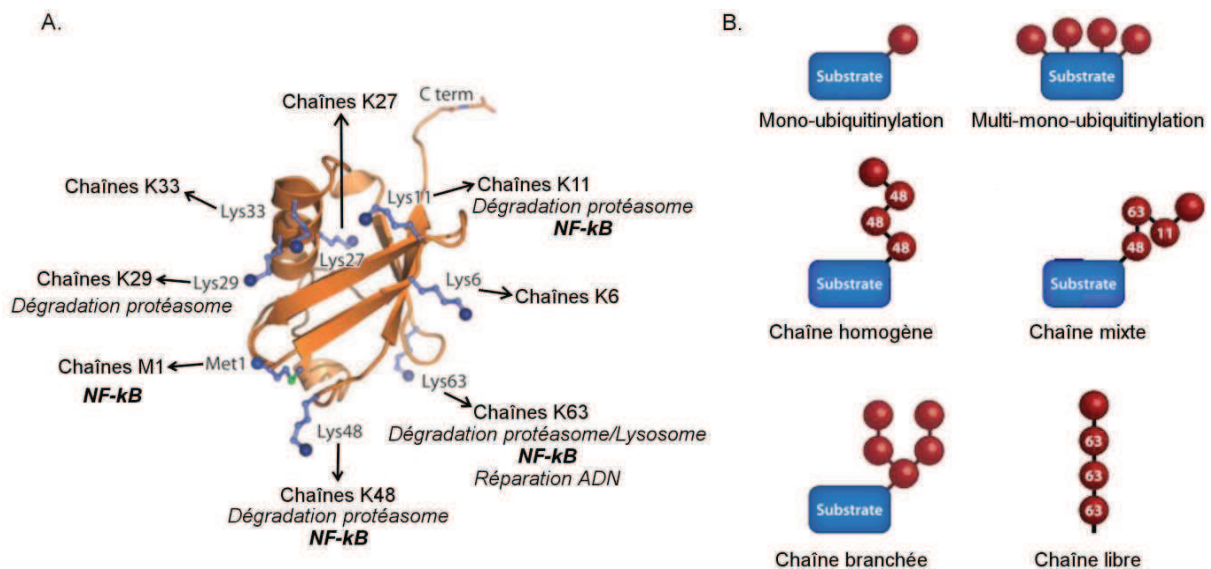


FIGURE 48 : LA STRUCTURE DE L'UBIQUITINE ET DES CHAINES D'UBIQUITINE

A. L'ubiquitine adopte une conformation en « β -grasp » avec les 7 résidus lysine et le résidu méthionine 1 qui pointent dans toutes les directions et permettent la formation de chaînes d'ubiquitine. Les principaux rôles de ces chaînes, identifiés jusqu'à présent, sont indiqués.

B. Schéma des différents types d'ubiquitylation des substrats.

Adaptés de (Komander and Rape, 2012).

Quatre gènes codent l'ubiquitine chez les mammifères, deux sous formes de poly-ubiquitine contenant 4 à 9 ubiquitines enchaînées tête à queue et deux sous forme de fusion avec des protéines ribosomales (Kimura and Tanaka, 2010). Dans tous les cas, avant toute conjugaison à des protéines substrats, les précurseurs d'ubiquitine doivent subir une maturation par des protéases spécifiques, les déubiquitinases (DUB). Cette maturation permet l'exposition du motif di-glycine nécessaire à la conjugaison en C-terminal de l'ubiquitine. La conjugaison à la protéine substrat résulte ensuite de 3 étapes successives catalysées par des enzymes différentes (**Figure 49**) (pour revue (Kerscher et al., 2006)). La première étape est l'adénylation de l'extrémité de l'ubiquitine à partir de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) catalysée par une enzyme d'activation E1 puis le transfert de l'ubiquitine sur la cystéine du site actif de l'enzyme E1 en formant une liaison thioester riche en énergie. L'ubiquitine est transféré lors d'une deuxième étape sur la cystéine de l'enzyme de conjugaison E2. Enfin l'ubiquitine est conjuguée à la protéine substrat avec l'aide de l'ubiquitine ligase E3. Il existe deux types d'ubiquitine ligase (pour revue (Metzger et al., 2012)). Les ubiquitine ligases à domaine RING (*Really Interesting New Gene*) servent d'adaptateurs entre l'enzyme de conjugaison et le substrat en interagissant avec les deux simultanément. Ces ubiquitine ligases rapprochent ainsi et positionnent correctement le substrat pour faciliter le transfert de l'ubiquitine. Les ubiquitine ligases à domaine HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*) reçoivent d'abord l'ubiquitine sur la cystéine de leur site actif avant de la transférer à la protéine substrat. Comme l'essentiel des processus cellulaires, l'ubiquitinylation est une modification transitoire et finement régulée dans le temps grâce aux déubiquitinases (DUB). L'ubiquitine clivée du substrat est recyclée et peut de nouveau être conjuguée à de nouveaux substrats.

Seules deux enzymes E1 ont été identifiées jusqu'à présent, environ 40 E2 et plus de 600 E3 existent chez les eucaryotes. Alors que la spécificité de reconnaissance du substrat a longtemps été attribuée aux enzymes E3 du fait de leur position privilégiée dans le processus d'ubiquitinylation et de leur diversité importante, il s'avère en fait que la spécificité est plutôt déterminée par le couple E2-E3 (Komander and Rape, 2012). Une diversité importante existe également au niveau des DUB puisqu'une centaine a été recensée.

L'ubiquitinylation des substrats se fait essentiellement par formation d'une liaison isopeptidique entre le groupe carboxyle de la glycine C-terminale de l'ubiquitine et le groupement amine ϵ d'une lysine du substrat. Cependant, même si les lysines restent les

sites privilégiés de l'ubiquitylation, de plus en plus de sites alternatifs ont été décrits. La conjugaison de l'ubiquitine sur le groupe amine de la méthionine N-terminale des substrats est maintenant bien reconnue même si elle reste moins fréquente que la conjugaison sur les lysines (pour revue (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004)). Plus récemment, l'ubiquitylation de plusieurs substrats sur des résidus cystéine, sérine ou thréonine par estérification a été décrite (pour revue (Wang et al., 2012)).

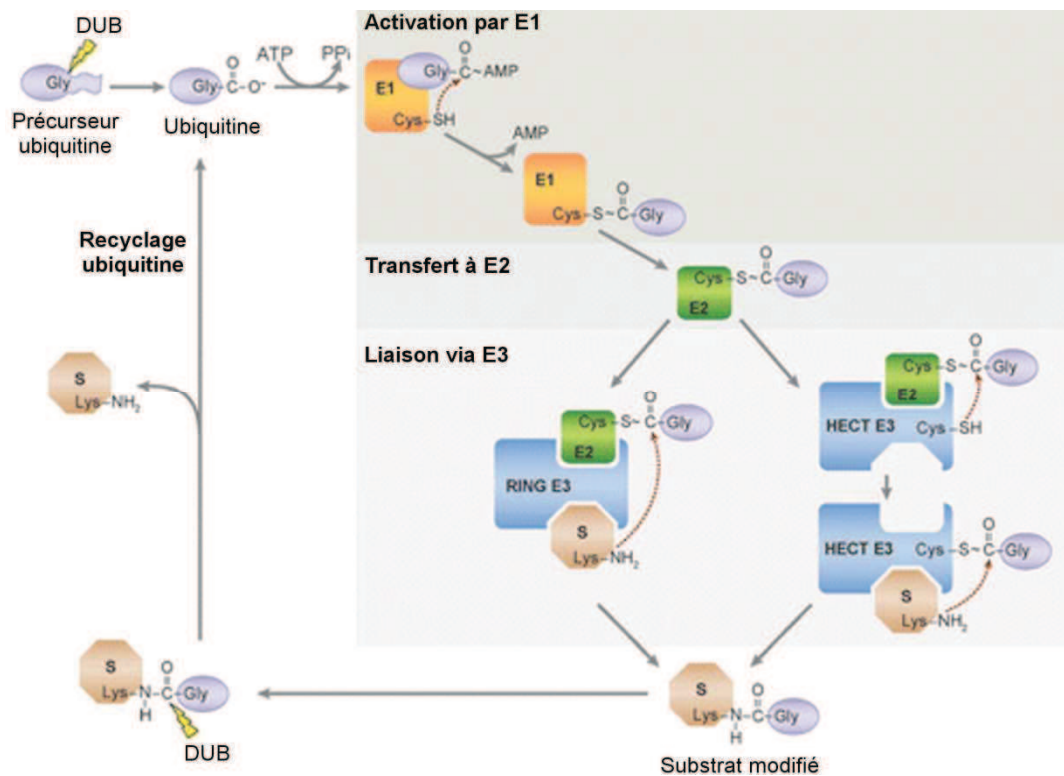


FIGURE 49 : CYCLE DE CONJUGAISON A L'UBIQUITINE

Avant d'être conjugué, le précurseur ubiquitine doit être clivé. L'ubiquitine est ensuite activée par l'enzyme d'activation E1 et conjuguée à la cystéine du site actif de l'enzyme. L'ubiquitine est ensuite transférée sur le site actif de l'enzyme de conjugaison E2 et enfin au substrat avec l'aide d'une ubiquitine ligase E3. Le substrat peut être déubiquitinylé par des protéases spécifiques, les déubiquitinases (DUB) et l'ubiquitine peut être recyclée. Adapté de (Kerscher et al., 2006).

Certains substrats seront ainsi mono-ubiquitylés ou multi-mono-ubiquitylés si plusieurs lysines du substrat sont conjuguées à une ubiquitine en même temps (**Figure 48B**). Cependant, dans de nombreux cas, le processus d'ubiquitylation se répète en ciblant cette fois les lysines de l'ubiquitine pour former des chaînes d'ubiquitine.

(2) LES CHAINES D'UBIQUITINE : UN CODE A ELUCIDER

L'ubiquitine contient elle-même 7 lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) qui peuvent permettre la conjugaison à un autre monomère d'ubiquitine. Ainsi par conjugaison

de plusieurs ubiquitines les unes sur les autres, des chaînes très variées aussi bien au niveau de la longueur que de la structure peuvent être formées (pour revue (Komander and Rape, 2012)). Dans certains cas, ce processus requiert, en plus des enzymes E1, E2 et E3, la présence de facteurs d'élongation appelés E4 (Hoppe, 2005). La structure la plus simple, les chaînes homogènes, est l'enchaînement d'ubiquitines toujours liées par les mêmes lysines (**Figure 48B**). En fonction du résidu de la première ubiquitine ciblé pour la conjugaison de la deuxième ubiquitine, on définira le type de liaison de la chaîne. De façon intéressante, ces sept lysines et l'extrémité N-terminale de l'ubiquitine (M1), qui peut également être conjuguée à une autre ubiquitine, sont réparties sur toute la surface de la structure tridimensionnelle de l'ubiquitine et pointent dans toutes les directions, impliquant des orientations distinctes pour les différentes chaînes en fonction de leur type de liaison (**Figure 48A**). Des structures plus complexes ont également été observées, telles que des chaînes mixtes dans lesquelles plusieurs types de liaisons sont utilisées successivement ou les chaînes branchées lorsque plusieurs lysines d'une même ubiquitine sont conjuguées en même temps à d'autres ubiquitines (**Figure 48B**). Cependant, le rôle physiologique et l'abondance de ces chaînes branchées n'est pas claire mais il a été suggéré qu'elles pourraient agir comme inhibiteur dominant négatif du protéasome (Randles and Walters, 2012). Enfin, des chaînes libres, c'est-à-dire non associées à un substrat, d'ubiquitine liées en K63 ont également été décrites (**Figure 48B**). Les conséquences de l'ubiquitylation des protéines substrat reposent sur la reconnaissance spécifique des différentes chaînes d'ubiquitine par d'autres protéines grâce à une grande diversité de domaines de liaison à l'ubiquitine (pour revue (Komander and Rape, 2012)).

Les chaînes homogènes restent les plus étudiées et les mieux comprises. Ces chaînes peuvent adopter une conformation fermée, dans laquelle les monomères d'ubiquitine partagent de nombreuses interactions entre eux. C'est le cas des chaînes K6, K11, K27 et K48. Au contraire, les chaînes K29, K33, K63 et M1 adoptent une conformation ouverte, plus flexible, dans laquelle les monomères ne sont liés entre eux que par la liaison isopeptidique (Randles and Walters, 2012). Même si toutes les liaisons possibles ont été détectées dans les cellules, leur abondance est très variable et l'importance physiologique des chaînes les moins abondantes K6, K27, K29 et K33, pour lesquelles peu de substrats sont connus, est encore mal comprise (**Figure 48A**). Les chaînes liées en K48 sont les plus abondantes et les premières dont le rôle a été élucidé : envoyer les protéines vers la dégradation par le

protéasome. Cependant, plusieurs études récentes montrent que ces chaînes pourraient avoir une fonction non protéolytique (pour revue (Trempe, 2011)). Au contraire, d'autres chaînes sont progressivement impliquées dans l'envoi des protéines à la dégradation par le protéasome (K11, K29 et K63) ou par les lysosomes (K63) (Komander and Rape, 2012). Malgré tout, les fonctions les plus connues des chaînes K63 restent la régulation des interactions et des activités protéiques, notamment dans la voie de signalisation NF- κ B.

(3) L'UBIQUITINE ET LA VOIE NF- κ B : INDISSOCIABLES

Aujourd'hui, il est clair que l'ubiquitylation de nombreuses protéines et la coopération de plusieurs types de chaînes d'ubiquitine sont essentielles dans l'activation de la voie NF- κ B (pour revue (Iwai, 2012; Schmukle and Walczak, 2012)). Tout d'abord, la conjugaison de chaînes K48 sur l'inhibiteur I κ B α est nécessaire à sa dégradation par le protéasome (**Figure 50**). Mais d'autres chaînes sont également requises notamment pour former une plate-forme de signalisation au niveau d'un récepteur activé. En effet, en étant conjuguées covalamment avec certaines protéines et en interagissant de façon non covalente avec d'autres partenaires qui possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine, les chaînes d'ubiquitine servent de « ciment » pour la formation des complexes protéiques. Pour une question de simplicité, nous ne décrivons ici que l'activation de la voie par le récepteur au TNF.

Les chaînes K63 ont été les premières chaînes d'ubiquitine à effet non protéolytique découvertes grâce à leur rôle dans l'activation de la voie NF- κ B. Dans le complexe de signalisation associé au récepteur du TNF, de nombreuses protéines ont été décrites conjuguées à des chaînes K63 : RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*), TRAF2, cIAP1 et cIAP2, TAK1 et NEMO. TRAF2, dont la fonction est en partie redondante avec celle de TRAF5, favorise l'ubiquitylation de RIP1, soit directement en association avec son co-activateur, la sphingosine-1-phosphate et l'enzyme E2 Ubc13, soit indirectement par le biais du recrutement de cIAP1/2. Dans ce cas, cIAP1/2, avec l'enzyme E2 Ubc5, peut également ubiquityler RIP1. RIP1 est essentiel pour le recrutement du complexe IKK grâce aux domaines de liaison à l'ubiquitine de la sous-unité NEMO régulatrice. Ce recrutement peut favoriser le regroupement de complexes IKK et leur activation par transphosphorylation. Un autre modèle suggère que le recrutement du complexe IKK et du complexe TAK1 via sa sous-unité TAB2 sur les chaînes d'ubiquitine permet la phosphorylation d'IKK par TAK1 (**Figure**

50). De plus, l'ubiquitinylation de TAK1 avec des chaînes K63 serait nécessaire à son activité kinase alors que l'ubiquitinylation de NEMO avec des chaînes K63 pourrait induire un changement de conformation du complexe IKK favorable à sa phosphorylation. Des chaînes d'ubiquitine K63 libres peuvent également activer les complexe TAK1 et IKK (Xia et al., 2009). Cependant des études ont récemment montré que l'absence d'Ubc13 ou la mutation de la lysine K63 de l'ubiquitine, empêchant la formation de chaînes d'ubiquitine liées en K63, ne bloquaient pas l'activation de la voie NF- κ B surtout à partir du récepteur au TNF. D'autres chaînes semblent donc impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B.

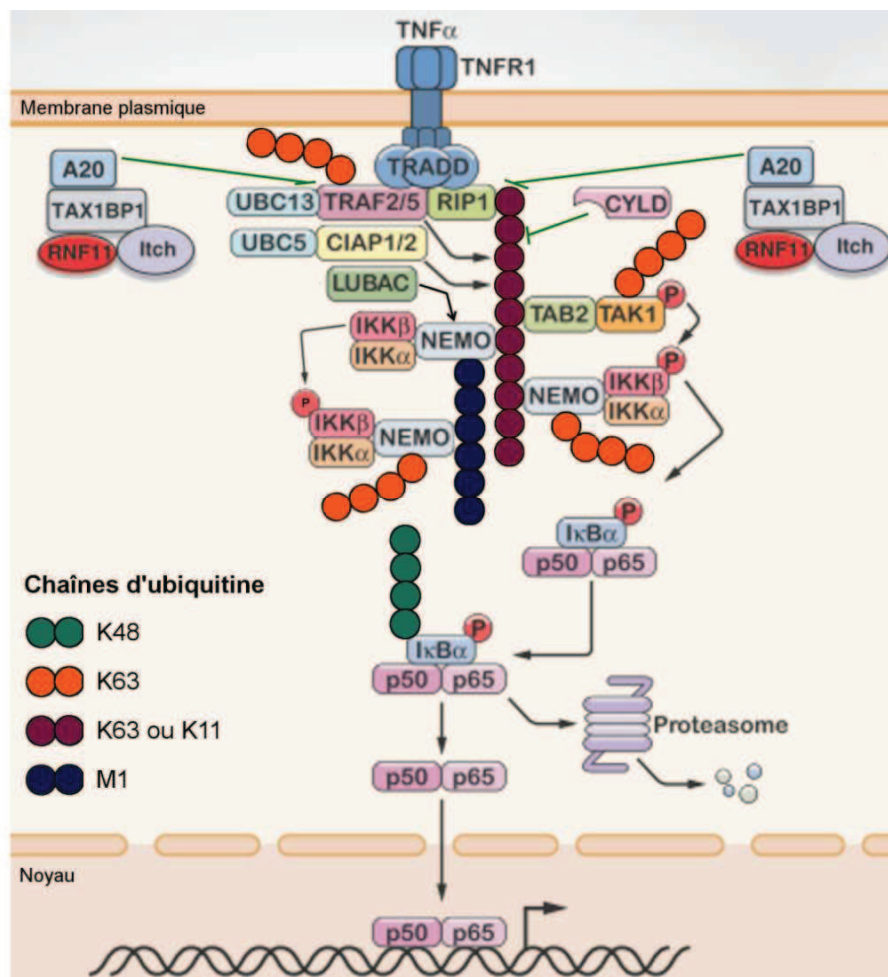


FIGURE 50 : L'UBIQUITINE DANS LA VOIE NF- κ B

L'ubiquitine est essentielle à la bonne activation de la voie NF- κ B. Les chaînes liées en K48 induisent la dégradation d'I κ B α alors que les chaînes liées en K63, K11 ou M1 servent de « ciment » pour l'association de tous les composants du complexe de signalisation au niveau du récepteur du TNF activé. Le complexe IKK peut ainsi être activé par phosphorylation. Deux modèles coexistent : l'activation par une kinase recrutée au niveau du complexe, comme TAK1, ou l'activation par regroupement de plusieurs complexes IKK et transphosphorylation. Il est à noter que RIP1 peut être ubiquitinylé par plusieurs types de chaînes d'ubiquitine, K63 ou K11, même si une seule chaîne est représentée. CYLD et le complexe A20 sont des régulateurs négatifs de la voie NF- κ B, notamment en déubiquitinylant RIP1, ce qui ne permet plus le recrutement et l'activation du complexe IKK. Le complexe A20 peut également induire la dissociation du complexe enzymatique E2 :E3 Ubc13 :TRAF2 et la dégradation de A20. Adapté de (Chen, 2012).

Les chaînes d'ubiquitine linéaires, c'est-à-dire liées sur les résidus M1 des ubiquitines, se sont révélées essentielles pour l'activation de cette voie. En effet, l'activation de la voie NF- κ B par le TNF est inhibée en absence de HOIL-1. HOIL-1, forme avec HOIP et SHARPIN, le complexe E3 ligase LUBAC (*Linear Ubiquitin chain Assembly Complex*) responsable de la formation des chaînes d'ubiquitine linéaire. Or ce complexe LUBAC est recruté au niveau du récepteur au TNF activé par l'intermédiaire de sa sous-unité HOIP et de l'activité E3 ubiquitine ligase de cIAP1/2 suggérant que HOIP est également capable de se lier sur l'une des nombreuses chaînes d'ubiquitine présentes au niveau de complexe de signalisation. NEMO/IKK γ est le substrat des chaînes d'ubiquitine linéaires synthétisées par NEMO. Cette polyubiquitylation semble critique pour l'activation du complexe IKK même si le mécanisme exact n'est pas encore compris. Cependant, NEMO/IKK γ est capable de s'associer aux chaînes d'ubiquitine linéaire et avec une meilleure affinité qu'aux autres chaînes d'ubiquitine, notamment liées en K63 (Kensche et al., 2012). L'ubiquitylation de NEMO/IKK γ pourrait donc permettre un changement de conformation du complexe IKK favorable à sa phosphorylation ou un regroupement de complexe IKK et une activation par transphosphorylation (**Figure 50**).

Enfin, des chaînes d'ubiquitine liées en K11 sont également conjuguées sur RIP1 par les enzymes Ubc5-cIAP1/2 (E2-E3) et NEMO peut se lier à ces chaînes d'ubiquitine. Un niveau supplémentaire de complexité se rajoute donc dans le modèle de formation du complexe de signalisation associé au récepteur au TNF et d'activation du complexe IKK (**Figure 50**).

Attestant du rôle crucial de l'ubiquitylation dans l'activation de la voie NF- κ B, les principaux mécanismes de régulation négative de la voie reposent sur des déubiquitinases, notamment CYLD (*Cylindromatosis*) et A20 (**Figure 50**) (pour revue (Harhaj and Dixit, 2012)). CYLD est une déubiquitinase qui permet de limiter l'activation de la voie NF- κ B. En effet, CYLD interagit de façon constitutive avec NEMO/IKK γ et élimine les chaînes K63 sur différents substrats dont TRAF2, NEMO mais également TAK1 et RIP1 (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Reiley et al., 2007; Trompouki et al., 2003; Wright et al., 2007). Lors de l'activation du récepteur au TNF, le complexe IKK activé peut phosphoryler CYLD de manière transitoire, inhibant ainsi sa fonction déubiquitinase (Reiley et al., 2005). Ce mécanisme permet une activation de la voie NF- κ B uniquement en présence d'un stimulus et de manière transitoire. Un mécanisme de rétrocontrôle négatif permet également de

mettre un terme à l'activation de la voie après stimulation et éviter les effets délétères d'une activation constitutive. Il repose sur la formation du complexe A20 (*A20-ubiquitin editing complex*), constitué de la déubiquitinase A20, de TAX1BP1 et des ubiquitine ligases Itch et RNF11. Or l'expression de A20 est induite par NF- κ B et la phosphorylation de TAX1BP1 par IKK α est essentielle à la formation du complexe, ne permettant l'association de ce complexe qu'après stimulation de la voie NF- κ B pour y mettre un terme (Laherty et al., 1993; Shembade et al., 2011). Le complexe et particulièrement A20 va agir de 2 façons pour inhiber la voie (**Figure 50**). D'une part, A20 possède également une activité ubiquitine ligase, en plus de son activité déubiquitinase, qui va lui permettre de cliver les chaînes K63 sur RIP1 puis un peu plus tard de catalyser la conjugaison de RIP1 à des chaînes K48 et d'induire ainsi sa dégradation (Wertz et al., 2004). De façon intéressante, A20 seul déubiquitine préférentiellement des chaînes K48 et c'est la présence des autres membres du complexe qui semble changer sa spécificité (Komander et al., 2009). D'autre part, le complexe A20 peut bloquer les interactions entre enzymes E2 et E3, et notamment entre TRAF2 et Ubc13, et induire la dégradation de l'enzyme E3, Ubc13 par exemple (Shembade et al., 2010).

(4) L'UBQUITINYLATION DE TAX ET L'INTERACTION AVEC LA VOIE NF- κ B

Tax étant capable d'interagir avec le protéasome, la question s'est rapidement posée de savoir si Tax était ubiquitinylé (Beraud and Greene, 1996; Rousset et al., 1996). En effet, la mono- et poly-ubiquitinylation de Tax a été démontrée sans pour autant induire sa dégradation par le protéasome (Chiari et al., 2004; Peloponese et al., 2004). L'étude de mutants de Tax dans lesquels différentes lysines, parmi les 10 que compte Tax, avaient été remplacées par des arginines a permis de déterminer que les lysines C-terminales, et particulièrement les lysines 4 à 8, sont les principales cibles de l'ubiquitinylation (**Figure 47**) (Chiari et al., 2004; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Les formes ubiquitinylées de Tax sont essentiellement constituées de chaînes K63 et détectées dans le cytoplasme, particulièrement au niveau d'agrégats périnucléaires associés à l'appareil de Golgi et au centrosome (Kfoury et al., 2008; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006; Shembade et al., 2007).

Fonctionnellement, cette ubiquitinylation de Tax par des chaînes K63 est essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B, mise en évidence par la translocation nucléaire de RelA

une fois I κ B α dégradé, et notamment pour l'interaction de Tax avec NEMO/IKK γ (Harhaj et al., 2007; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006; Shembade et al., 2007). En effet, les chaînes K63 de Tax sont indispensables pour recruter le complexe IKK au niveau du centrosome puis libérer les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β actives dans le cytosol (Kfoury et al., 2008). Les domaines impliqués dans l'interaction entre Tax et NEMO ont été décrits comme étant un domaine riche en leucine et deux domaines leucine-zipper respectivement (Xiao et al., 2000). Cependant, le recrutement facilité de NEMO grâce à son interaction avec les chaînes d'ubiquitine de Tax reste une hypothèse possible du rôle des chaînes d'ubiquitine dans l'activation de la voie NF- κ B. Pourtant, la complémentation de cellules Jurkat déficientes en NEMO par des protéines mutées (D311N et L329P) et incapables de s'associer aux chaînes d'ubiquitine rétablit l'activation de la voie NF- κ B par Tax mais pas par le TNF (Wu and Sun, 2007). Cela suggère que, contrairement à la voie d'activation par le TNF, les propriétés de liaison à l'ubiquitine de NEMO ne sont pas requises pour l'activation de la voie NF- κ B par Tax, impliquant deux mécanismes différents d'activation par le TNF et par Tax. Une autre possibilité est le recrutement par Tax de kinases, comme TAK1 avec sa sous-unité TAB2 par exemple grâce à ses chaînes d'ubiquitine. Une étude récente montre que l'ubiquitinylation de Tax favorise le passage de Tax dans les corps nucléaires ainsi que le recrutement de NEMO dans ces corps nucléaires alors que Tax ubiquitinylé n'est pourtant pas observé dans ces corps (Kfoury et al., 2011). L'ubiquitinylation de Tax semble aussi requise pour l'activation de TAK1 (Yu et al., 2008). L'enzyme de conjugaison (E2) impliquée dans cette ubiquitinylation a été clairement identifiée : Ubc13 (Shembade et al., 2007). En effet, Tax interagit directement avec Ubc13 et sa déplétion des cellules par siARN réduit considérablement l'ubiquitinylation de Tax et sa capacité à activer la voie NF- κ B. Par contre, l'identité de l'ubiquitine ligase impliquée est moins claire. Plusieurs candidates ont été suggérées. Une étude a montré que les protéines TRAF2, 5 et 6 augmentent significativement l'ubiquitinylation de Tax en présence d'ubiquitine avec une étiquette HA (Yu et al., 2008). Une autre étude a montré que l'ubiquitine ligase RNF4 pouvait interagir avec Tax et augmentait de façon cohérente l'ubiquitinylation de Tax, à la fois *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la localisation cytoplasmique de Tax et son activation de la voie NF- κ B (Fryrear et al., 2012). Un autre facteur cellulaire s'est révélé activateur de l'ubiquitinylation de Tax et donc de sa capacité à activer la voie NF- κ B : la protéine Optineurine/NRP (*NEMO*-

Related Protein) (Journo et al., 2009). Alors que Tax et NRP colocalisent dans les agrégats périnucléaires, l'interaction de des 2 protéines requiert à la fois la présence des lysines cibles de l'ubiquitinylation de Tax et le domaine de liaison à l'ubiquitine de NRP. NRP coopère avec la protéine TAX1BP1, également un partenaire de Tax, pour augmenter la polyubiquitinylation de Tax et l'activation de la voie NF- κ B.

L'ubiquitinylation de Tax et donc sa capacité à activer la voie NF- κ B peuvent également être régulées par des déubiquitinases comme l'a montré une étude récente. Usp20, une déubiquitinase, est capable d'interagir avec Tax et diminue significativement la quantité de Tax conjuguée à l'ubiquitine après co-transfection de Usp20 et Tax dans des cellules 293T (Yasunaga et al., 2011). L'importance de l'ubiquitinylation de Tax dans sa capacité à activer la voie NF- κ B a également été confirmée puisque l'expression de Usp20 supprime l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Or l'expression de Usp20 est justement fortement diminuée dans plusieurs lignées de cellules transformées par HTLV-1. Des résultats préliminaires semblent incriminer des mécanismes épigénétiques : méthylation de l'ADN et acétylation des histones. Pourtant, la surexpression de Usp20 dans ces cellules diminue leur prolifération, confirmant le potentiel inhibiteur de cette protéine et l'importance de la voie NF- κ B dans la prolifération et la transformation des cellules (Yasunaga et al., 2011). Une autre étude a également démontré que CYLD pouvait interagir avec Tax et inhiber son ubiquitinylation et donc l'activation du complexe IKK (Wu et al., 2011). Cependant, là encore, CYLD est constitutivement inactivé dans les cellules transformées par HTLV-1 ou par Tax mais cette fois-ci par phosphorylation.

Bien que l'ubiquitinylation par des chaînes K63 soit majoritaire, la conjugaison de Tax à des chaînes K48 a également été décrite notamment en présence d'inhibiteurs du protéasome (Kfoury et al., 2008; Yan et al., 2009a). Ces formes de Tax sont retrouvées dans le cytoplasme mais surtout dans le noyau (Yan et al., 2009a). L'ubiquitine ligase impliquée dans ce processus a été clairement identifiée. Il s'agit de PDLIM-2, une enzyme déjà impliquée dans la dégradation du facteur NF- κ B p65. La surexpression de PDLIM-2 induit la conjugaison de Tax à des chaînes K48 et sa relocalisation dans la matrice nucléaire où Tax est dégradé par le protéasome (Yan et al., 2009a). PDLIM-2 inhibe donc l'activation aussi bien de la voie NF- κ B que de la voie CREB induite par Tax et protège les cellules de la transformation induite par Tax. Cependant, comme pour Usp20, dans les cellules transformées par HTLV-1,

l'expression de PDLIM-2 est réprimée essentiellement par méthylation de l'ADN indépendamment de la présence de Tax, inhibant ainsi ses propriétés inhibitrices de la tumorigenèse (Yan et al., 2009b). De plus, une déubiquitinase STAMBPL-1, identifiée très récemment, diminue la conjugaison de Tax à ces chaînes K48 et stabilise Tax, principalement en favorisant son export nucléaire et donc en l'éloignant du site de dégradation induite par PDLIM-2. Cette action de STAMBPL-1 est essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B par Tax car la diminution de son expression par siARN induit une forte réduction de l'activation de la voie canonique et non-canonique (Lavorgna and Harhaj, 2012).

Le stress génotoxique induit une relocalisation cytoplasmique de Tax (Gatza and Marriott, 2006). La monoubiquitylation sur les lysines 7 et 8 (aa 280 et 284) est nécessaire pour l'export nucléaire suite à l'irradiation aux ultraviolets (UV) puisque la mutation de ces deux lysines bloque ce mécanisme (Gatza et al., 2007). Très récemment, il a été montré que la déplétion de l'ubiquitine ligase RNF4 et de la déubiquitinase STAMBPL1 par siARN inhibe fortement cet export nucléaire de Tax observé suite à une irradiation des cellules aux UV, suggérant un rôle de ces deux enzymes dans ce mécanisme (Fryrear et al., 2012; Lavorgna and Harhaj, 2012).

L'ubiquitylation de Tax est donc essentielle à l'activation de la voie NF- κ B (**Figure 54**). Mais Tax va également favoriser l'ubiquitylation des autres facteurs de la voie NF- κ B en inhibant les mécanismes de régulation négative : CYLD et le complexe A20. Dans les cellules transformées exprimant Tax, CYLD est détecté majoritairement sous forme phosphorylée et donc inactivée (Wu et al., 2011). Tax se protège ainsi de sa propre déubiquitylation mais également bloque le rôle régulateur de CYLD sur la voie NF- κ B en général. En interagissant avec TAX1BP1, Tax empêche la formation du complexe A20 et bloque donc son activité inhibitrice (Shembade et al., 2008). De plus, l'interaction de Tax avec Ubc13 protège cette protéine de la dégradation induite par le complexe A20 (Shembade et al., 2010). En préservant les complexes Ubc13/E3 ligases, Tax préserve sa propre ubiquitylation mais également celle des autres membres de la voie NF- κ B.

c) SUMOylation

(1) LES PROTEINES SUMO : UNITE ET DIVERSITE

Les protéines SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), identifiées plus récemment, appartiennent à la famille des Ubl (pour revue (van der Veen and Ploegh, 2012; Wilkinson

and Henley, 2010)). En effet, ces protéines adoptent la même conformation en β -grasp, ne partageant pourtant que moins de 20% d'homologies de séquence avec l'ubiquitine (Vertegaal, 2011). Les protéines SUMO sont tout aussi essentielles au fonctionnement cellulaire que l'ubiquitine. En effet, la SUMOylation est décrite dans de plus en plus de processus cellulaires, allant de la régulation de la transcription et de la réparation de l'ADN à la biogenèse des ribosomes et au transport nucléo-cytoplasmique. Il existe 4 SUMO paralogue chez l'Homme (**Figure 51**).

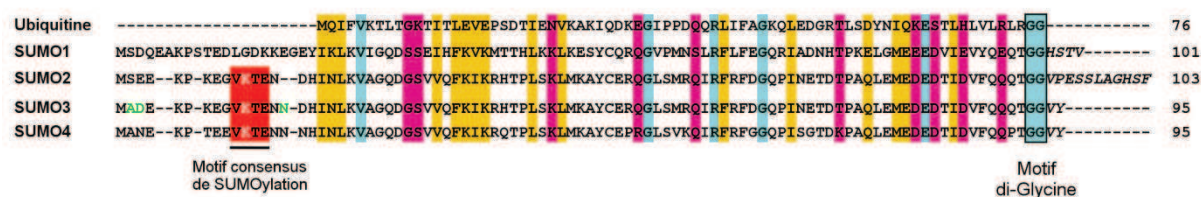


FIGURE 51 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES DE L'UBIQUITINE ET DES 4 SUMO CHEZ L'HOMME

Les 4 protéines SUMO paralogue chez l'Homme appartiennent à la famille des UBL (*Ubiquitin-Like Protein*). L'alignement met en évidence les résidus conservés entre les 5 protéines (cyan) qui comptent notamment le motif di-glycine C-terminal essentiel à la conjugaison au substrat. Les résidus présents après ce motif (en italique) sont clivés lors de l'étape de maturation du précurseur préalable à toute conjugaison. Les changements conservatifs et semi-conservatifs sont également colorés en violet et jaune respectivement. Le motif consensus de SUMOylation absent de SUMO1 est coloré en rouge avec la lysine 11, cible de la SUMOylation, en blanc. Les 3 acides aminés qui différencient SUMO3 de SUMO2 sont en vert. Adapté de (Wilkinson and Henley, 2010).

SUMO1, le premier identifié, est une protéine de 11 kDa. SUMO2 et SUMO3 sont très proches et ne diffèrent que par 3 acides aminés. Ils sont donc considérés comme équivalents et désignés comme SUMO2/3. Par contre, SUMO2/3 ne présente qu'environ 50% de similarité avec SUMO1 et une des différences majeures consiste en la présence d'un site consensus de SUMOylation dans SUMO2/3 mais pas dans SUMO1 (**Figure 51**). En effet, comme pour l'ubiquitylation, la SUMOylation cible les lysines mais un environnement préférentiel pour ces lysines a été décrit, identifiant clairement un site consensus de SUMOylation: Ψ KxE. Bien que beaucoup des substrats de SUMO possèdent un site consensus de SUMOylation, la SUMOylation reste possible sur des lysines en dehors de ce site consensus. SUMO1 et SUMO2/3 contiennent plusieurs lysines dans leur séquence qui pourrait leur permettre, comme c'est le cas pour l'ubiquitine, de former des chaînes. Cependant, la présence du site consensus de SUMOylation, au niveau de la lysine 11, ne semble autoriser la formation que de chaînes de SUMO2/3 alors que les chaînes de SUMO1

n'ont pu être observées qu'*in vitro*. La protéine SUMO1 peut par contre servir de terminateur de chaîne à l'extrémité des chaînes SUMO2/3. Une autre différence majeure entre SUMO1 et SUMO2/3 réside dans leur disponibilité dans la cellule. Alors que SUMO2/3 est présent sous forme libre dans le nucléoplasme des cellules, SUMO1 est essentiellement retrouvé sous forme conjuguée à des protéines substrats localisées surtout au niveau de l'enveloppe nucléaire, du nucléole mais aussi du cytoplasme. Ainsi, lors d'un stress cellulaire, une forte augmentation de la SUMOylation est observée mais essentiellement par SUMO2/3. SUMO4 est le dernier paralogue identifié d'après sa similarité de séquence à 87% avec SUMO2. Cependant, l'expression et la conjugaison SUMO4 à des substrats dans les cellules n'est pas encore claire et sa fonction encore moins même si une association avec le diabète a été décrite.

Pour la conjugaison des différents SUMO à leur substrat, le mécanisme est très proche de celui de l'ubiquitinylation. De la même façon que pour l'ubiquitine, il faut d'abord un clivage du précurseur pour exposer le motif di-glycine. Cette fonction est remplie par la famille des SENP (*Sentrin/SUMO-specific protease*). SUMO est ensuite pris en charge par une enzyme d'activation E1 puis une enzyme de conjugaison E2. Contrairement à la diversité qui peut exister parmi les enzymes de la machinerie d'ubiquitinylation, une seule E1 (hétérodimère SAE1/SAE2) et une seule E2 (Ubc9) ont pour l'instant été identifiées dans la machinerie de SUMOylation. Du fait de la capacité d'Ubc9 de lier directement les substrats de la SUMOylation *in vitro* grâce au motif consensus de SUMOylation, la question s'est longtemps posée de la nécessité d'une E3 SUMO ligase pour le processus de SUMOylation. Cependant, des activités E3 SUMO ligases, facilitant la SUMOylation des substrats, ont été décrites pour de plus en plus de protéines. Toutes ces E3 SUMO ligases fonctionnent suivant le modèle RING des ubiquitine ligases en rapprochant Ubc9 et le substrat sans être conjuguées à SUMO elles-mêmes. La SUMOylation, comme l'ubiquitinylation, est une modification transitoire, régulée par la présence des SENP qui peuvent déconjuguer le substrat et recycler les protéines SUMO.

SUMO1 et SUMO2/3 ont des fonctions bien spécifiques et distinctes puisque seul 15% de leurs substrats sont communs. Pour les autres substrats, il doit exister une reconnaissance spécifique ne permettant la conjugaison que de l'un ou de l'autre bien que les premières enzymes E1 et surtout E2 soient communes aux deux paralogues. Par contre, les enzymes E3 ubiquitines ligases, dont le nombre et la diversité augmentent

régulièrement, peuvent jouer un rôle dans la conjugaison spécifique à l'un des paralogues. Certaines SUMO protéases SENP ont une préférence entre SUMO1 et SUMO2/3 pouvant donc favoriser l'une ou l'autre des conjugaisons. Enfin, cette spécificité peut également reposer sur des interactions non covalentes spécifiques entre les protéines SUMO et des motifs d'interactions à SUMO (SIM) des substrats avant la conjugaison covalente.

Ainsi, bien que partageant une séquence assez proche et des mécanismes de conjugaison communs, les protéines SUMO1 et SUMO2/3 semblent avoir des fonctions bien distinctes dans les cellules, matérialisées par leurs localisations subcellulaires différentes. La spécificité de conjugaison de l'un ou l'autre des paralogues est donc essentielle pour induire les réponses cellulaires adéquates.

(2) SUMO ET LA VOIE NF- κ B : LE DEBUT D'UNE HISTOIRE

La SUMOylation est un processus également impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B (pour revue (Lee and Miyamoto, 2011; Mabb and Miyamoto, 2007)). Les connexions entre les deux processus sont pour l'instant limitées mais progressent régulièrement et de nombreuses protéines de la voie de signalisation NF- κ B possèdent des sites potentiels de SUMOylation, suggérant une augmentation probable des liens entre SUMOylation et NF- κ B dans les prochaines années.

Actuellement, deux protéines de la voie seulement sont la cible de SUMOylation, essentiellement par SUMO1 : I κ B et NEMO. La conjugaison de I κ B α à SUMO1 a en effet été décrite. Cette SUMOylation cible la lysine 21, celle-là même sur laquelle sont formées les chaînes d'ubiquitine en K48 qui envoient I κ B α à la dégradation. La SUMOylation de I κ B α protège donc la protéine de la dégradation et inhibe la voie. Cette lysine 21 a plus récemment été associée à une conjugaison de SUMO2/3 en réponse à l'hypoxie. Contrairement à l'effet inhibiteur de la SUMOylation par SUMO1, la conjugaison de SUMO2/3 à I κ B α favorise la dissociation du dimère NF- κ B et l'activation de la transcription. Enfin, un autre membre de la famille I κ B est également la cible de SUMOylation : p100. La conjugaison basale de p100 à SUMO1 s'est révélée essentielle pour permettre ensuite la phosphorylation de p100 et l'activation de la voie non-canonique.

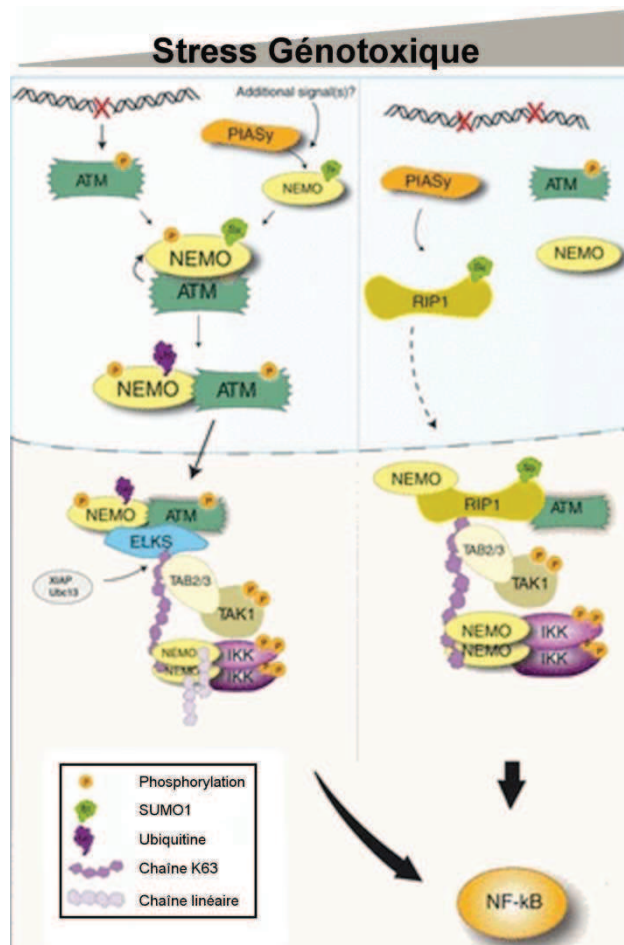


FIGURE 52 : SUMOYLATION ET ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB EN REPONSE AU STRESS GENOTOXIQUE

Modèles d'activation de la voie NF-κB en réponse au stress génotoxique en fonction de la sévérité du stress et du type cellulaire. Dans les deux cas, le signal part du noyau avec l'activation d'ATM et la SUMOylation de NEMO ou RIP1 par PIASy. Le signal est ensuite transduit dans le cytoplasme avec la formation de complexes aboutissant à l'activation du complexe IKK. Adapté de (McCool and Miyamoto, 2012).

NEMO est également SUMOylé mais uniquement lors d'un stress génotoxique (**Figure 52**) (pour revue (McCool and Miyamoto, 2012)). En cas de lésions à l'ADN, NEMO s'accumule dans le noyau conjugué à SUMO1. PIASy est la SUMO ligase qui avec Ubc9 SUMOyle NEMO, très probablement dans le noyau. D'autres co-facteurs, de cette SUMOylation ont également été identifiées : PIDD (*p53-Induced protein with Death Domain*), RIP1 et PARP1 (*Poly-ADP Ribose Polymerase 1*). Une fois SUMOylé, NEMO est reconnu par la kinase ATM, activée par les cassures double-brin. NEMO est donc phosphorylé puis monoubiquitinylé, ce qui va induire son export nucléaire et la formation d'un complexe avec les sous-unités catalytiques IKKα et IKKβ mais également ATM qui peut activer le complexe IKK. Des études récentes semblent impliquer TAK1 comme intermédiaire dans l'activation de IKK par ATM. Là encore,

la SUMOylation et l'ubiquitylation ciblent les mêmes lysines mais contrairement au cas de I κ B α où les deux modifications post-traductionnelles sont en compétition, dans le cas de NEMO, elles coopèrent pour aboutir à l'activation de la voie NF- κ B. Le rôle essentiel joué par la SUMOylation de NEMO dans l'activation de la voie NF- κ B en réponse au stress génotoxique a été récemment renforcé par la mise en évidence de l'induction de l'expression de la SUMO protéase SENP2 en réponse à l'activation de cette voie. SENP2 peut en retour diminuer la SUMOylation de NEMO et donc l'activation de la voie. La régulation de la SUMOylation de NEMO et de peut-être d'autres substrats, est donc un rétrocontrôle négatif important de la voie NF- κ B induite par le stress génotoxique, comme l'est la régulation de l'ubiquitylation par le complexe A20 dans le rétrocontrôle de la voie NF- κ B induite par le TNF.

RIP1 a également été impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B en réponse au stress génotoxique. L'ubiquitylation de RIP1 est toujours requise mais elle dépend dans ces conditions d'une SUMOylation préalable par PIASy (**Figure 52**).

(3) LA SUMOYLATION DE TAX ET L'INTERACTION AVEC LA VOIE NF- κ B

La SUMOylation de Tax a été décrite et comme pour les exemples décrits ci-dessus, elle cible en partie les mêmes lysines que l'ubiquitylation (**Figure 47**). Des formes de Tax conjuguées à SUMO1 endogène ont en effet été purifiées à partir de cellules 293T transfectées (Lamsoul et al., 2005). Mais Tax peut également être conjugué à des chaînes de SUMO2/3 comme cela a été montré en co-transfectant les cellules avec Tax et HA-SUMO2 ou HA-SUMO3 (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Or la mutation des lysines 7 et 8 de Tax diminue fortement cette conjugaison aux différentes protéines SUMO, identifiant ces deux lysines, déjà impliquées dans l'ubiquitylation de Tax, comme cibles majeures de la SUMOylation (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Par contre, à part Ubc9, les enzymes impliquées dans la SUMOylation de Tax ne sont pas connues.

La SUMOylation de Tax est associée à sa localisation dans les corps nucléaires. Des expériences de fractionnement démontrent d'abord une localisation uniquement nucléaire des formes SUMOylées de Tax (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Plus précisément, des expériences d'immunofluorescence ont permis d'observer la colocalisation de Tax avec SUMO1 transfecté ou endogène et avec SUMO3 transfecté dans les corps nucléaires (Kfoury

et al., 2011; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). La localisation de Tax dans ces corps nucléaires a été clairement associée à leur profil de SUMOylation. Les mutants de lysines de Tax ne présentant pas ou peu de SUMOylation ne forment pas de corps nucléaires. Par contre, la fusion de SUMO1 à ces mutants permet de restaurer au moins partiellement la formation des corps nucléaires, suggérant un rôle de la SUMOylation de Tax dans la formation des corps nucléaires (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Cependant, récemment, la fusion à l'ubiquitine a également permis de restaurer la formation de corps nucléaires par certains mutants (Kfoury et al., 2011). De plus, la surexpression de HA-SUMO1 augmente la proportion de cellules présentant uniquement des corps nucléaires, renforçant l'idée d'un rôle de la SUMOylation dans la formation des corps nucléaires Tax (Lamsoul et al., 2005). Mais Ubc9, l'enzyme de conjugaison de SUMO, ainsi que SUMO1 endogène ayant été observés dans les corps nucléaires Tax, ceux-ci peuvent également être des sites actifs de SUMOylation (Kfoury et al., 2011).

Fonctionnellement, la SUMOylation de Tax est nécessaire à l'activation optimale de la transcription à partir de promoteurs à éléments de réponse κ B. Cette conclusion repose toujours sur l'étude de certains mutants de lysine de Tax qui, bien qu'induisant la translocation nucléaire de RelA en lien avec leur ubiquitinylation, ne sont pas capables d'induire la transcription d'un gène rapporteur à partir d'un promoteur à élément de réponse κ B. La fusion à SUMO1 de ces mutants permet, outre la restauration de la formation des corps nucléaires Tax, la restauration de l'activation de la transcription dépendante de NF- κ B (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Ainsi, bien que ciblant en partie les mêmes lysines, l'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax semblent, comme dans le cas de NEMO et du stress génotoxique, coopérer pour permettre une activation optimale de la voie NF- κ B. Cette coopération a notamment été mise en évidence dans le contrôle de la localisation subcellulaire de NEMO. L'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax se révèlent en effet toutes deux nécessaires au recrutement de NEMO dans les agrégats périnucléaires (Kfoury et al., 2011). Très récemment, une enzyme s'est justement révélée faire le lien entre SUMOylation et ubiquitinylation de Tax : RNF4 (Fryrear et al., 2012). RNF4 est une ubiquitine ligase ciblant les protéines SUMOylées, STUbL (*SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase*). Or la déplétion de RNF4 diminue l'ubiquitinylation de Tax et Tax fusionné à SUMO1 est ubiquitinylé par RNF4 *in vitro*. De façon intéressante, l'enzyme RNF4 peut ubiquitinyler

les protéines substrats mais également directement les chaînes de poly-SUMO et former ainsi des chaînes mixtes SUMO/ubiquitine (Tatham et al., 2008).

Le rôle de la SUMOylation dans l'activation de la transcription à partir d'un promoteur CREB est par contre moins clair. Alors qu'une étude ne montre aucun effet de la SUMOylation sur cette transcription (Nasr et al., 2006), une autre montre le contraire notamment en lien avec l'importance de la formation des corps nucléaires pour l'activité CREB induite par Tax (Lamsoul et al., 2005).

La protéine Tax est donc la cible de nombreuses régulations post-traductionnelles qui permettent de réguler finement sa localisation subcellulaire et ses diverses fonctions, notamment sa capacité à activer la voie NF- κ B.

D. TAX2 : EN PARTIE RESPONSABLE DE LA FAIBLE PATHOGENICITE DU VIRUS HTLV-2

Contrairement au virus HTLV-1, le virus HTLV-2 n'a été associé à aucun développement de leucémies chez les personnes infectées (cf II-E-4). Pourtant, HTLV-2 est capable de transformer des cellules *in vitro* mais moins efficacement que Tax1 (Endo et al., 2002; Higuchi et al., 2007). De plus, HTLV-2 immortalise préférentiellement les L_T CD8+ *in vitro*, alors que le tropisme préférentiel de HTLV-1 est L_T CD4+. Les différences de pathogénicité entre HTLV-1 et HTLV-2 ont été en majeure partie expliquées par des différences entre Tax1 et Tax2 (pour revue (Bertazzoni et al., 2011)). Notamment, alors que Tax1 induit la formation de micronuclei, marqueur d'anomalies génétiques, dans les cellules où elle s'exprime, Tax2 n'en n'est pas capable (Semmes et al., 1996).

1. TAX1 ET TAX2, UNE DIFFERENCE DE STRUCTURE : LE DOMAINE PBM

Parmi les 3 sous-types, Tax2B est la protéine la mieux caractérisée et la plus proche de Tax1. Alors que Tax2B possède une séquence de 356 acides aminés, Tax2 ne contient que 331 acides aminés. Alors que Tax1 et Tax2 ont de nombreux domaines en commun et présentent 85% de similarité de leur séquence protéique, une différence importante entre les deux séquences a été mise en évidence et reliée aux plus faibles capacités transformantes de Tax2. Alors que Tax1 est capable d'interagir avec les protéines à domaine

PDZ grâce à un motif de liaison au domaine PDZ (PBM) présent à son extrémité C-terminale, Tax2 ne possède pas ce motif (Rousset et al., 1998). Or la présence de ce motif PBM, notamment en permettant l'interaction de Tax1 avec le suppresseur de tumeur hDlg, a été corrélée aux capacités transformantes de Tax1 (Hirata et al., 2004). En effet, une protéine Tax1 dont le PBM a été enlevé n'est plus capable, tout comme Tax2, de transformer des cellules CTLL-2 pour les faire passer d'une croissance dépendante à une croissance indépendante de l'IL-2 (Tsubata et al., 2005). L'importance du motif PBM pour la transformation des cellules a été confirmée par la construction de protéines chimériques où le motif PBM de Tax1 a été ajouté à Tax2. L'activité transformante de Tax2 devient alors équivalente à celle de Tax1 avec notamment la formation de micronuclei comme marqueur de cette activité (Endo et al., 2002; Higuchi et al., 2007; Xie et al., 2006).

L'absence du motif PBM à l'extrémité C-terminale de Tax2 pourrait donc jouer un rôle dans la plus faible pathogénicité du virus HTLV-2.

2. TAX1 ET TAX2, UNE DIFFERENCE DE LOCALISATION : NUCLEAIRE VERSUS CYTOPLASMIQUE

Contrairement à Tax1, plusieurs études ont décrit la présence de Tax2 essentiellement dans le cytoplasme (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2006). La présence de Tax2 dans le noyau sous formes d'agrégats a également été observée (Sheehy et al., 2006). Turci *et al.*, en utilisant une protéine Tax avec une étiquette Flag, ont conclu à une distribution similaire de Tax1 et Tax2, présentes à la fois dans le noyau et le cytoplasme de cellules 293T. La seule différence observée dans cette étude est la présence de Tax2 dans le cytoplasme de toutes les cellules alors que Tax1 n'est dans le cytoplasme que d'environ la moitié des cellules positives (Turci et al., 2009). Dans le cytoplasme, Tax2 colocalise avec la calréticuline, un marqueur du réticulum endoplasmique (Avesani et al., 2010).

La présence plus importante de Tax2 dans le cytoplasme par rapport à Tax1 a été associée à la séquence entre les acides aminés 90 et 100 de Tax2 grâce à des protéines chimères (Meertens et al., 2004). De plus, des signaux de localisation nucléaire et d'export nucléaire ont été identifiés même si ce dernier n'est pas indispensable pour la localisation subcellulaire de Tax2 (Meertens et al., 2004; Turci et al., 2006).

3. TAX1 ET TAX2, UNE DIFFERENCE DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Alors que, à part la sérine 336, tous les résidus phosphorylés identifiés dans Tax1 sont conservés dans Tax2, la phosphorylation de Tax2 n'a pas encore été démontrée.

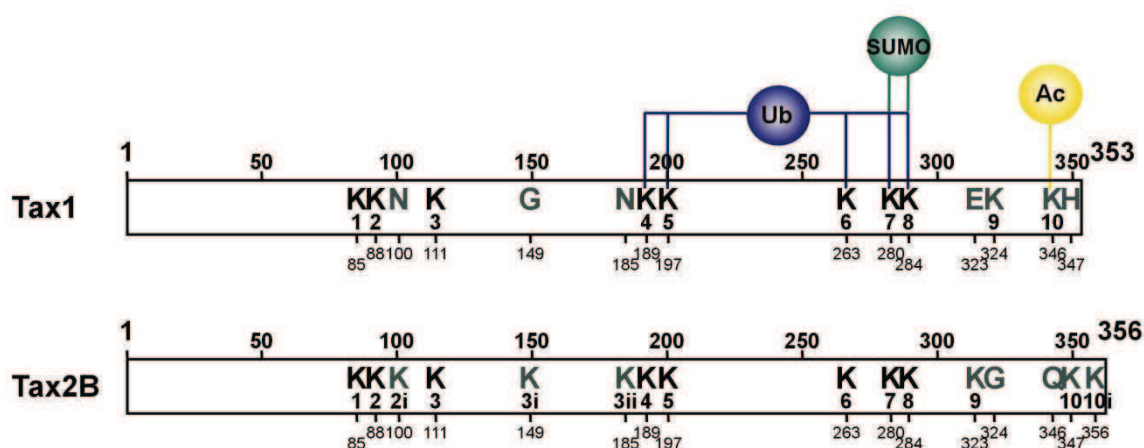


FIGURE 53 : LES LYSINES DE TAX1 ET TAX2B

Tax1 contient 10 lysines alors que Tax2B contient 14 lysines dont 8 sont conservées entre Tax1 et Tax2. Ces lysines conservées sont marquées en noir alors que les autres sont marquées en gris. Les 4 lysines supplémentaires de Tax2B sont appelées 2i, 3i, 3ii et 10i. Toutes les lysines de Tax1 cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation (K4 à K8) sont conservées dans Tax2B. Cependant les lysines de Tax2B cibles des modifications post-traductionnelles n'ont pas encore été clairement identifiées.

En plus des 10 lysines de Tax1, Tax2 contient 4 lysines supplémentaires : 2i, 3i, 3ii et 10i. La plupart des lysines de Tax1 sont conservées dans Tax2, notamment les lysines cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation sur Tax1 (**Figure 53**). L'acétylation de Tax2 a été montrée même si elle n'a pas été étudiée en détail (Lodewick et al., 2009). Une seule étude a pour l'instant montré l'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax2 de façon similaire à Tax1 (Turci et al., 2009). La seule différence est l'observation de très peu de formes mono-, di- et tri-SUMOylées de Tax2 par rapport à Tax1. Par contre, aucune étude n'a pour l'instant décrit les lysines cibles de ces modifications post-traductionnelles dans Tax2 ni l'impact de ces modifications sur l'activité de Tax2, notamment sa capacité à activer la voie NF-κB.

4. TAX1 ET TAX2, UNE DIFFERENCE D'ACTIVATION, NOTAMMENT DES VOIES NF-κB

Des différences d'activité de Tax1 et Tax2 ont également été mises en évidence. Tout d'abord, Tax2 apparaît moins efficace pour transactiver le promoteur viral (Ye et al., 2003). Au niveau moléculaire, il a été montré que Tax2 recrute CBP/p300 sur le LTR viral,

comme Tax1, mais pas P/CAF et que le facteur cellulaire CIITA (*MHC class II Transcriptional Activator*) inhibe la transactivation du LTR proviral par Tax2 (Casoli et al., 2004; Tosi et al., 2006).

Contrairement à Tax1, Tax2 n'induit pas la formation de micronuclei dans les cellules, ce qui peut être en lien avec l'incapacité de Tax2 d'inhiber le suppresseur de tumeur p53 (Mahieux et al., 2000; Semmes et al., 1996). Or p53 régule la mise en place de la machinerie de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire voire l'apoptose en cas de lésions à l'ADN. De plus, Tax2 n'induit pas ou peu de production de cytokines pro-inflammatoires ou d'IL-21 (Mizuguchi et al., 2009). Tax2 semble donc perturber moins fortement le fonctionnement cellulaire que Tax1.

Tax2 est capable d'activer la transcription à partir d'un promoteur à élément de réponse κ B (Huang et al., 2009; Meertens et al., 2004; Turci et al., 2009). Cependant, alors que Tax2 est en effet capable d'interagir avec NEMO et NRP (Huang et al., 2009; Journo et al., 2009; Meertens et al., 2004), Tax2 n'est par contre pas capable d'interagir avec p100 et d'induire sa dégradation en p52 (Higuchi et al., 2007). Tax2 n'est donc pas capable d'activer la voie NF- κ B non canonique contrairement à Tax1 et grâce à des protéines chimériques, cette différence entre Tax1 et Tax2 a été associée à un motif dans Tax1 (aa 225-232) divergent dans Tax2 (Shoji et al., 2009). Bien que Tax2 soit capable d'activer la voie canonique comme Tax1, il semble qu'il existe des différences dans les mécanismes d'activation. Ainsi, bien qu'interagissant avec NEMO, Tax2 ne recrute pas le complexe IKK dans les radeaux lipidiques de l'appareil de Golgi bien que Tax2 soit en partie présente dans ces micro-domaines (Huang et al., 2009). De plus, après co-transfection de Tax et IKK α ou β dans des cellules, Tax2 ne semble pas co-précipiter et donc interagir directement avec IKK α et β , contrairement à Tax1.

La protéine Tax2 présente donc des différences avec la protéine Tax1 qui peuvent expliquer en partie les différences de pathogenèse entre HTLV-1 et HTLV-2. En comparant les séquences et les activités de Tax1 et Tax2, ces différences peuvent donc nous apprendre beaucoup sur les déterminants de Tax importants pour ses activités transformantes.

IV. LE MODELE ACTUEL DE L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX ET NOUVELLES PROBLEMATIQUES

A. LA VOIE NF- κ B, UNE VOIE ESSENTIELLE DANS LES PROPRIETES TRANSFORMANTES DE TAX

Nous avons pu constater tout au long de cette introduction l'importance de l'activation de la voie NF- κ B dans toutes les activités attribuées à Tax : dérégulation du cycle cellulaire, inhibition de la réparation de l'ADN, inhibition de l'apoptose. Plusieurs études ont effectivement démontré le caractère essentiel de la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B pour immortaliser ou transformer les cellules. L'identification de mutations qui abolissaient spécifiquement la capacité de Tax à transactiver les promoteurs à éléments κ B ou CREB ont été d'excellents outils pour montrer que l'activation constitutive de NF- κ B était essentielle pour permettre à Tax de transformer des fibroblastes de rat (Yamaoka et al., 1996). Cette même approche a été utilisée pour montrer que l'immortalisation des lymphocytes T primaires humains dépendait également de la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B mais pas CREB (Robek and Ratner, 1999). Pour cette étude, Robek et Ratner ont notamment utilisé les mutants M22 (T130A-L131S) et M47 (L319R-L320S), caractérisés précédemment comme n'activant que la voie CREB ou que la voie NF- κ B respectivement et encore très utilisés aujourd'hui pour comprendre l'implication des deux voies dans les fonctions de Tax ou comme témoins négatifs de l'activation de l'une des deux voies par rapport à Tax (Smith and Greene, 1990). Le caractère essentiel de cette voie a également été démontré par des expériences dans lesquelles l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription NF- κ B p65 ou p50 inhibe la croissance de cellules fibroblastiques issues de tumeurs de souris transgénique exprimant Tax (Kitajima et al., 1993). Plus récemment, plusieurs études ont démontré que des inhibiteurs spécifiques de NF- κ B, Bay 11-7082, ACHP ou DHMEQ, induisent l'apoptose de lignées de lymphocytes T infectées par HTLV-1 ou de cellules ATLL, démontrant un rôle critique de la voie NF- κ B dans la survie de ces cellules (Mori et al., 2002; Ohsugi et al., 2007; Sanda et al., 2006; Watanabe et al., 2005).

Ce rôle essentiel de la voie NF- κ B dans les processus de transformation, la prolifération et la survie des cellules infectées par HTLV-1 m'a amené à étudier les mécanismes sous-jacents à son activation par Tax au cours de ma thèse.

B. L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX : LE MODELE ACTUEL

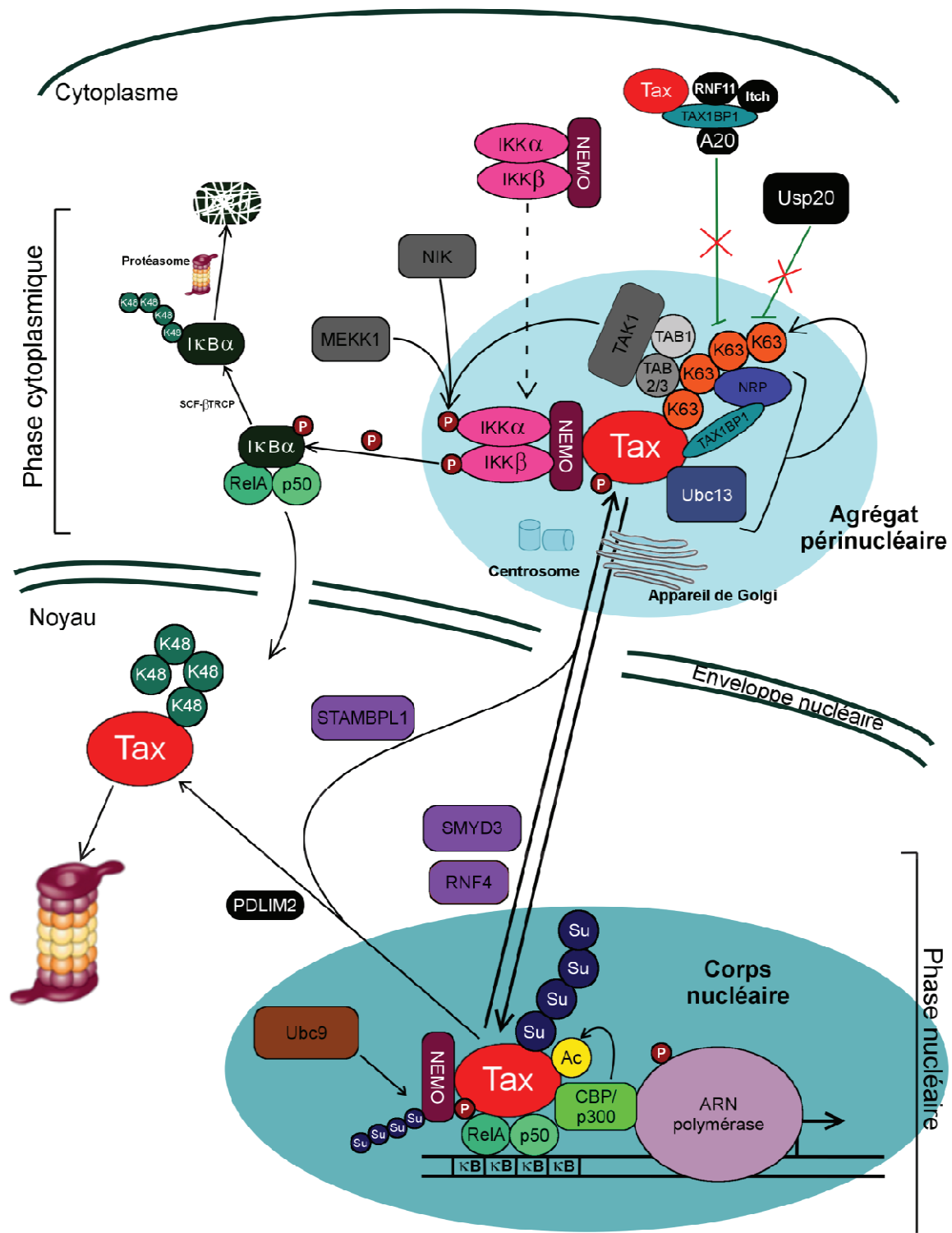


FIGURE 54 : MODELE ACTUEL DE L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B CANONIQUE PAR TAX

Le schéma est expliqué dans le texte. Les protéines inhibitrices de cette voie sont sur fond noir. Les kinases qui peuvent phosphoryler et activer le complexe IKK sont en gris. Les facteurs cellulaires qui favorisent l'export nucléaire sont sur fond violet. Les autres facteurs qui peuvent influencer l'activation de la voie NF- κ B par Tax ont chacun une couleur différente. Ac : groupement acétate ; P : groupement phosphate ; Su : SUMO ; K48 et K63 : chaînes d'ubiquitine liées en K48 ou en K63.

Dans le modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax, établi en partie grâce aux résultats du laboratoire, il existe deux phases d'activation : une phase cytoplasmique associée à l'ubiquitinylation de Tax et une phase nucléaire associée à la SUMOylation de Tax (**Figure 54**). Ces deux phases sont considérées comme essentielles pour l'activation optimale de la voie NF- κ B (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). De même, la phosphorylation de Tax sur les sérines 300/301 semble être indispensable à l'activation de la voie NF- κ B et au bon déroulement des deux phases car la phosphorylation est un pré-requis pour l'ubiquitinylation de Tax mais également pour sa migration dans le noyau et donc sa SUMOylation et acétylation (Avesani et al., 2010; Bex et al., 1999). Dans la phase cytoplasmique, Tax sous sa forme conjuguée aux chaînes d'ubiquitine K63 interagit avec NEMO et recrute le complexe IKK au niveau d'agrégats périnucléaires associés avec le centrosome et l'appareil de Golgi (Harhaj et al., 2007; Huang et al., 2009; Kfoury et al., 2008; Shembade et al., 2007). En favorisant la transphosphorylation des sous-unités catalytiques IKK α et β ou en recrutant des kinases telles que TAK1, MEKK1 ou NIK, Tax active de façon constitutive le complexe IKK qui peut phosphoryler I κ B α et permettre la translocation nucléaire des dimères NF- κ B, notamment RelA/p50 (Geleziunas et al., 1998; Sun and Yamaoka, 2005; Uhlik et al., 1998; Wu and Sun, 2007; Yin et al., 1998). Dans le cytoplasme, Tax est également capable d'empêcher la formation du complexe éditeur A20 en se liant à TAX1BP1. Tax bloque ainsi la dégradation d'Ubc13, enzyme de conjugaison essentielle à son ubiquitinylation (Shembade et al., 2010). Dans la phase nucléaire, Tax interagit directement avec les dimères NF- κ B et favorise leur fixation sur les promoteurs à éléments de réponse κ B (Pepin et al., 1994; Shembade et al., 2010; Suzuki et al., 1994). Cette action nucléaire de Tax a été attribuée aux formes SUMOylées de Tax et localisée dans les corps nucléaires où Tax recrute, en plus de RelA ou p50, les co-activateurs CBP et p300, l'ARN polymérase sous forme phosphorylée et NEMO (Bex et al., 1997). Ces corps nucléaires, en plus d'être considérés comme des structures transcriptionnellement actives, semblent aussi être des sites de SUMOylation, notamment de NEMO, grâce à la présence de Ubc9 (Kfoury et al., 2011). Grâce à la présence de p300, les corps nucléaires sont probablement le site de l'acétylation de Tax, qui est importante pour l'activation optimale de la voie NF- κ B (Lodewick et al., 2009). En parallèle, le recrutement de Tax dans le nucléoplasme et sa conjugaison à des chaînes d'ubiquitine K48 induits par PDLIM2, inhibe l'activation de la voie NF- κ B suite à

la dégradation de Tax (Yan et al., 2009a). Ce mécanisme reste cependant limité dans les cellules infectées par HTLV-1 du fait de la répression de l'expression de PDLIM2 (Yan et al., 2009b).

Cette situation n'est pas figée, puisque Tax circule entre les corps nucléaires et entre les corps nucléaires et les agrégats périnucléaires dans les deux sens à travers le pore nucléaire sans besoin de transporteur ou d'énergie (Kfoury et al., 2011; Tsuji et al., 2007). De plus, de nombreux partenaires cellulaires, capables de moduler les modifications post-traductionnelles ou la localisation de Tax ont été décrits ces dernières années et influencent l'activation de la voie NF- κ B. Des facteurs cellulaires, tels que l'histone méthyltransférase, SMYD3, ou l'ubiquitine ligase ciblant des protéines SUMOylées, RNF4, active la voie NF- κ B en favorisant l'export nucléaire voire l'ubiquitinylation de Tax (Fryrear et al., 2012; Yamamoto et al., 2011). La déubiquitinase STAMBPL1 favorise également l'export nucléaire de Tax et augmente l'activation de NF- κ B mais ce mécanisme a été plus précisément associé à une diminution de la conjugaison de Tax aux chaînes K48 et de sa dégradation (Lavorgna and Harhaj, 2012). Dans le cytoplasme aussi des facteurs favorisent l'activation de la voie par Tax. C'est le cas de NRP qui augmente l'ubiquitinylation de Tax et donc l'activation de la voie NF- κ B (Journo et al., 2009). Au contraire, Usp20, une déubiquitinase, diminue l'ubiquitinylation de Tax et l'activation de la voie, même si, là-encore, l'expression de Usp20 est diminuée dans les cellules infectées par HTLV-1 (Yasunaga et al., 2011).

C. PROBLEMATIQUES

Au laboratoire, nous avons pour objectif de préciser le modèle présenté ci-dessus et de répondre aux nombreuses questions qui se posent encore. Nos recherches sont surtout centrées sur l'importance des modifications post-traductionnelles dans l'activation de la voie NF- κ B. L'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax notamment sont aujourd'hui reconnues essentielles pour l'activation de cette voie, cependant plusieurs questions sont encore sans réponse en particulier sur leurs régulations et leur indépendance. De plus, alors que le modèle est bien établi pour la protéine Tax1, le mécanisme d'activation de la voie NF- κ B par Tax2 et l'influence des modifications post-traductionnelles sur cette voie sont plus flous.

Au cours de ma thèse, nous avons développé plusieurs axes de recherche pour répondre à ces questions.

1. LES PROTEINES TRAF, DES UBIQUITINES LIGASES DE TAX ?

Alors que l'ubiquitinylation de Tax dépend de l'enzyme de conjugaison (E2) Ubc13, les enzymes ubiquitine ligase (E3) associées à Ubc13 n'ont par contre pas été identifiées. Le rôle de RNF4 comme ubiquitine ligase de Tax a récemment été rapporté. Cependant, RNF4 est connue pour agir en association avec l'enzyme E2 UbcH5a et non avec Ubc13 (Plechanovova et al., 2012). De plus, RNF4 est une STUbL et cible donc les protéines SUMOylées. Or les résultats obtenus précédemment au laboratoire et par d'autres équipes, semblent montrer que l'ubiquitinylation de Tax ne dépend pas de sa SUMOylation puisque des mutants de lysines de Tax (Tax-R4-6K et Tax-K7-8R) non SUMOylés sont quand même ubiquitinylés (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). L'ubiquitinylation de Tax par RNF4 est donc plus probablement restreinte à des conditions particulières et notamment en cas de stress génotoxique. RNF4 est en effet impliqué dans l'export nucléaire de Tax suite à des dommages à l'ADN (Fryrear et al., 2012). D'autre part, PDLIM2, une autre ubiquitine ligase qui induit la conjugaison de Tax à des chaînes K48 dans le nucléoplasme a au contraire un effet négatif sur l'activation de la voie NF- κ B en entraînant la dégradation de Tax par le protéasome (Yan et al., 2009a).

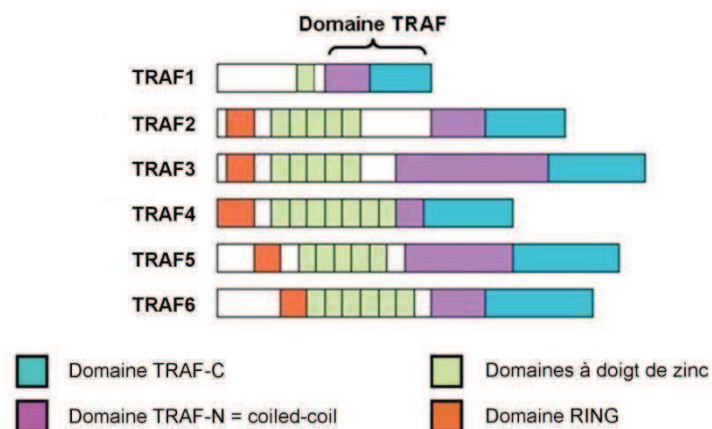


FIGURE 55 : ORGANISATION STRUCTURALE DES PROTEINES TRAF

La famille des protéines TRAF compte 6 membres bien caractérisés qui ont tous un domaine TRAF dans leur partie C-terminale. Les protéines TRAF2 à 6 possèdent également un domaine RING et des motifs à doigt de zinc dans leur partie N-terminale qui leur confèrent une activité ubiquitine ligase (Adapté de (Chung et al., 2002)).

Les E3 ubiquitines ligases impliquées dans la conjugaison constitutive de Tax à des chaînes K63 dans le cytoplasme sont donc encore inconnues. Au laboratoire, nous nous sommes intéressées aux protéines TRAF qui semblent être de bonnes candidates. La famille des protéines TRAF compte 6 membres bien étudiés possédant tous un domaine TRAF

caractéristique en C-terminal, divisé en un sous-domaine TRAF-N, correspondant à une hélice super-enroulée, et un sous-domaine TRAF-C très conservé (pour revue (Chung et al., 2002)) (**Figure 55**). Un septième membre, ne contenant pas ce domaine TRAF-C, a été récemment identifié et reste mal caractérisé (Zotti et al., 2012). Le domaine TRAF permet l'oligomérisation des protéines TRAF-1 à 6 et leur interaction avec de nombreux partenaires cellulaires. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation, notamment la voie NF- κ B. Un domaine RING et plusieurs motifs à doigt de zinc (5 à 7), importants pour la fonction d'ubiquitine ligase, sont présents dans la partie N-terminale des protéines TRAF. TRAF1 est dépourvu de cette fonction puisqu'il ne possède qu'un seul motif à doigts de zinc et pas de domaine RING. Les protéines TRAF sont déjà connues pour ubiquitinyler des substrats impliqués dans la voie NF- κ B et pour fonctionner avec l'enzyme E2 Ubc13. De plus, une étude a suggéré que certaines protéines TRAF pouvaient augmenter l'ubiquitinylation de Tax lorsqu'elles sont surexprimées (Yu et al., 2008).

Les protéines TRAF sont donc de bonnes ubiquitine ligases candidates et il nous a paru intéressant de tester l'impact de plusieurs de ces protéines sur l'ubiquitinylation de Tax.

2. UBIQUITINYLATION ET SUMOYLATION DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B : CHACUN SON RÔLE

L'importance de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B a essentiellement été mise en évidence grâce aux mutants de lysines de Tax. Or les lysines cibles de l'ubiquitinylation (K4 à K8) et de la SUMOylation (K7 et K8) sont en partie les mêmes. Il est donc très difficile de différencier le rôle particulier de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation dans l'activation de la voie NF- κ B grâce à ces mutants. De plus, même si ces mutants laissent suggérer que la SUMOylation n'est pas requise pour l'ubiquitinylation de Tax puisque le mutant K7-8R dans lequel les lysines 7 et 8 sont mutées est partiellement ubiquitinylé mais pas SUMOylé (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006), l'importance de l'ubiquitinylation pour la SUMOylation de Tax ne peut par contre pas être déterminée avec ces mutants de lysines. En effet, la mutation des lysines ciblées par l'ubiquitine implique également la mutation des lysines cibles de SUMO.

Au laboratoire, nous avons donc cherché à mieux comprendre le rôle individuel de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B, notamment grâce à la caractérisation d'un nouveau mutant.

3. ROLE DES CORPS NUCLEAIRES DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

La composition des corps nucléaires Tax est aujourd'hui bien connue. Par contre, leur fonction reste plus floue. Ils ont été décrits comme des sites de transcription active à la fois pour des gènes avec des promoteurs à éléments de réponse CRE ou κ B même si cette transcription semble possible en dehors des corps nucléaires (Bex et al., 1998; Semmes and Jeang, 1996). De plus, les corps nucléaires ont également été décrits comme des sites de SUMOylation ou de séquestration de la machinerie de réparation de l'ADN.

La ou les fonctions exacte(s) des corps nucléaires restent donc à déterminer. Nous avons notamment cherché à confirmer leur implication dans l'activation de la voie NF- κ B. En effet, leur rôle avait déjà été fortement suggéré mais toujours par l'étude des mutants de lysines et de fusion de SUMO1 à ces mutants (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006).

4. ROLE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX2

Le virus HTLV-2 étant beaucoup moins pathogène que le virus HTLV-1, la comparaison entre les deux virus peut permettre de mettre en évidence des propriétés spécifiques du virus HTLV-1 à l'origine de sa pathogénicité. Des différences d'activation de NF- κ B par Tax1 et Tax2 ont déjà été mises en évidence puisque Tax2 n'active pas la voie alterne contrairement à Tax1 (Higuchi et al., 2007). L'activation de NF- κ B étant centrale dans la pathogénèse de HTLV-1, il est important de comprendre les différences d'activation des voies NF- κ B par Tax1 et Tax2. Les modifications post-traductionnelles étant essentielles dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax1, il est nécessaire de déterminer si ces modifications jouent également un rôle important pour l'activation de NF- κ B par Tax2. Nous savons que les lysines de Tax1 cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation sont conservées dans la séquence de Tax2 mais une seule étude a montré récemment que Tax2 pouvait être ubiquitinylé et SUMOylé en présence d'ubiquitine et de SUMO surexprimé dans les cellules (Turci et al., 2009). En collaboration avec l'équipe du Pr. Renaud Mahieux à l'ENS Lyon, nous avons donc cherché à mieux caractériser les modifications post-traductionnelles, en particulier ubiquitinylation et SUMOylation, que peut subir Tax2. La localisation subcellulaire de Tax1 dépendant étroitement de ses modifications post-traductionnelles, nous nous sommes également intéressés à la localisation de Tax2 et bien sûr à ses capacités d'activation de la voie NF- κ B canonique.

MATERIELS ET METHODES

I. CELLULES

Les cellules sont cultivées dans une atmosphère à 5% de CO₂ et à 37°C. Plusieurs types cellulaires ont été utilisés.

- Les cellules adhérentes des lignées HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*, cellules embryonnaires de rein humain) et HeLa (cellules issues d'un carcinome du col de l'utérus) sont cultivées en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* 41966, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco) et 2mM de Glutamine (Gibco).
- Les cellules T des lignées Jurkat et CEM et les lignées infectées par le virus HTLV-1 C8166 (Bhat et al., 1993) et HUT-102 (Poiesz et al., 1980) sont cultivées en RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biowest), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco), 2mM de Glutamine (Gibco) et 0,43% de glucose (Gibco).
- Les L_T CD4⁺ primaires sont purifiés à partir de cônes de sang complet ou de cônes de plasma/plaquettes obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang. Après séparation des cellules mononucléaires par centrifugation sur gradient de Ficoll (Sigma), les L_T CD4⁺ sont purifiés par sélection positive grâce à des billes immuno-magnétiques (Beckton Dickinson). Les L_T CD4⁺ purifiés sont cultivés en RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum humain inactivé (Sigma), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco), 2mM de Glutamine (Gibco), 0,43% de glucose (Gibco) et 50U/mL d'interleukine-2 (IL-2, Pepro Tech) et 3mg/mL de phytohémaglutinine-M (PHA-M, Sigma).

II. PLASMIDES ET SIARN

- Toutes les constructions Tax utilisées dans cette étude codent une protéine Tax1 avec une étiquette 6-Histidines (His) fusionnée à son extrémité C-terminale et clonée dans le vecteur psG5M. Les plasmides codant les protéines Tax, les mutants de lysines (Tax-K4-8R, Tax-K6-8R, Tax-K7-8R, Tax-K7R et Tax-K1-10R), Tax-SUMO1, Tax-M22 (T130A/L131S) et Tax-M47 (L319S/L320S) ont été décrits dans la littérature (Chiari et al., 2004; Kfoury et al., 2008; Nasr et al., 2006). Le mutant Tax-P79AQ81A a été généré à partir du plasmide codant la protéine Tax grâce à 3 réactions de PCR.

Deux PCR séparées sont d'abord réalisées avec d'une part une amorce mutagène sens [5'CTCCTTCGCGACCGCGAGAACCTCTAAG3'] et une amorce de clonage TaxPmlIR [5'CACGTGGGGCAGGAGGGGCCAGGTG3'] et d'autre part une amorce mutagène antisens [5'CTTAGAGGTTCTCGCGGTCGCGAAGGAG3'] et une amorce de clonage TaxEcoF [5'GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTC3']. Les deux fragments amplifiés sont mélangés pour réaliser une troisième PCR globale avec les amorces TaxPmlIR et TaxEcoF. Le produit de PCR final est cloné dans un vecteur pTOPO (Invitrogen). Le plasmide pTOPO-Tax-P79AQ81A est ensuite digéré par les enzymes de restriction EcoRI et PmlI et le fragment obtenu est inséré dans le vecteur pSG5M-Tax avec une étiquette 6-Histidines. L'introduction des mutations est vérifiée par digestion avec l'enzyme NruI dont le site de restriction a été inséré dans les amorces mutagènes. Les mutations P79AQ81A sont également introduites dans le plasmide codant Tax-SUMO1-His en échangeant les fragments EcoRI-PmlI. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

- Les plasmides Tax2B-His et Tax2B-K0-His nous ont été donnés par le Pr. Renaud MAHIEUX (ENS Lyon, France).
- Les plasmides codant la protéine HA-ubiquitine sauvage ou mutée sur toutes ses lysines sauf K63 nous ont été donnés par le Dr. Pierre JALINOT (Vitte et al., 2006). Le laboratoire du Dr. Hugues DE THE nous a fourni la construction HA-SUMO1.
- Les plasmides pκB-Luc et pLTR-Luc, codant la luciférase Firefly sous contrôle d'un promoteur contenant 4 éléments de réponse κB (dépendant de NF-κB) ou d'un LTR de HTLV-1 (dépendant de CREB) respectivement, de même que le plasmide pRL-TK, codant la luciférase Renilla sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase, ont été décrit précédemment (Kfoury et al., 2008; Nasr et al., 2006). Ces 3 plasmides nous ont été donnés par le Pr. Renaud MAHIEUX.
- Les plasmides codant les protéines Flag-TRAF1 et Flag-TRAF2 ont été donnés au laboratoire par le Dr. Andreas TSAPIS (Institut Paris-Sud sur les cytokines, France) (Hatzoglou et al., 2000). Le plasmide pSG5M-Flag-TRAF5 a été cloné au laboratoire à partir du cDNA (Image). La séquence de l'ensemble de ces plasmides a été vérifiée.
- Le siARN contrôle (sc-37007) et les siARN TRAF1 (sc-29508), TRAF2 (sc-44276) et TRAF5 (sc-36715) sont fournis par Santa Cruz.

III. ANTICORPS

Pour cibler la protéine Tax1, un mélange de sérums de patients infectées par le virus HTLV-1 a été utilisé en immunoblot alors qu'un anticorps monoclonal anti-Tax 168-A51 (NIH) a été utilisé en immunofluorescence et pour les immunoprécipitations. Pour cibler en parallèle les protéines Tax1-His et Tax2-His ou leurs mutants, nous avons utilisé un anticorps anti-Histidine (27-4710-01, GE Healthcare).

Pour détecter les modifications post-traductionnelles endogènes, nous avons utilisés les anticorps suivants : anti-ubiquitine P4D1 (Tebu Bio) ou Fk2 (Millipore), anti-chaînes d'ubiquitine liées en K63 (D7A11, Cell Signaling) ou anti-SUMO2/3 (ab3742, Abcam).

Les autres anticorps primaires suivant ont également été utilisés : anti-Flag (M2, Sigma), anti-HA (12CA5, Roche), anti-NEMO (sc-8330 Santa-Cruz), anti-RelA (sc-372, Santa-Cruz), anti-Phospho-IKK α et β (C84E11, Cell Signaling), anti-GM130 (610822, BD Biosciences) et anti-Lamines A/C (2032, Cell Signaling). Des billes d'agarose couplées à des anticorps anti-Flag M2 sont utilisées pour les immunoprécipitations Flag (F2426, Sigma).

Les anticorps secondaires utilisés sur les immunoblot sont des anticorps anti-humain, anti-souris et anti-lapin couplés à la peroxydase du radis noir (HRP, *Horseradish Peroxidase*) (Promega). En immunofluorescence, des anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin couplés au fluorophores suivants ont été utilisés : isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Jackson ImmunoResearch), Alexa Fluor 594 et Cyanine 5 (Invitrogen).

IV. TRANSFECTION TRANSITOIRE

Différents protocoles de transfection ont été appliqués en fonction du type cellulaire et des expériences pour obtenir des taux de transfection et une quantité de matériel suffisante.

- La technique des précipités au phosphate de calcium est utilisée pour transfecter les cellules 293T et les cellules HeLa pour les expériences d'immunofluorescence et de transactivation de promoteurs. Avec cette technique, les plasmides sont dilués dans un tampon HBS (*Hepes Buffered Saline*, Sigma) dilué au 1/2 puis du CaCl₂ à 2M est ajouté goutte à goutte pour former de petits précipités ADN/phosphate de calcium. Les précipités sont ensuite déposés sur les cellules puis le milieu de culture est remplacé 6h après.

- Pour les analyses des modifications post-traductionnelles, les immunoprécipitations et les fractionnements, les cellules HeLa sont transfectées avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur.
- Les cellules T Jurkat ou CEM sont transfectées avec du DMRIE-C (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. La veille de la transfection, les cellules sont placées dans des conditions de croissance exponentielle.
- Les lymphocytes T CD4+ sont également placés dans des conditions exponentielles de croissance dans un milieu sans IL-2 et sans PHA-M la veille de la transfection. Les cellules sont nucléofectées avec le protocole Amaxa (VPA-1002, Lonza) en utilisant le programme T-023 en suivant les instructions du fournisseur. $5 \cdot 10^6$ cellules sont transfectées pour chaque point.

V. ANALYSE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Les cellules 293T ($1,5 \cdot 10^6$) ou les cellules HeLa ($4 \cdot 10^6$) sont ensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre la veille de la transfection. 24h après la transfection ou 48h en présence de siARN, les cellules sont lysées dans un tampon A (6M Guanidine-HCl, 0.1M NaH_2PO_4 , 10mM imidazole, pH 8) puis soniquées. Ce tampon permet de lyser les cellules dans des conditions très stringentes et très dénaturantes, ce qui présente deux avantages : éliminer toutes les protéines non liées covalamment à Tax et au contraire préserver les modifications post-traductionnelles en inhibant l'action des déubiquitinases et des SUMO protéases. Les lysats cellulaires sont ensuite incubés avec une résine de nickel (His-select HF agarose beads, SIGMA) pendant 3h à température ambiante, sous agitation, pour fixer les protéines portant l'étiquette 6-His. Puis, la résine est abondamment lavée avec le tampon A (3 fois) puis le tampon B (tampon A dilué au $\frac{1}{4}$ dans le tampon C, 2 fois) et enfin le tampon C (25mM Tris-HCl pH 6.8, 10mM imidazole, 2 fois). Les protéines retenues sont finalement éluées par du tampon Laemmli (Sigma) et analysées par immunoblot.

VI. IMMUNOPRECIPITATION

Les cellules HeLa sont ensemencées à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules dans des boîtes de 10 cm de diamètre la veille de la transfection. 24h après la transfection les cellules sont lysées en tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8 ; NaCl 150mM ; NP40 1%, désoxycholate de

sodium 0,5% ; SDS 0,1% et mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases [Roche]) pendant 30 min à 4°C. 1/10 des lysats sont préservés et dilués dans du tampon Laemmli (Sigma). Le reste des lysats est incubé avec 10 µL de billes couplées à des anticorps anti-Flag ou 2µL d'anticorps anti-Tax ou anti-His pendant une nuit à 4°C sous agitation. Les complexes immuns sont ensuite précipités grâce à des billes de sépharose couplées à des protéines G (GE Healthcare) pendant une heure à 4°C sous agitation constante. Puis, les billes sont rincées 5 fois avec du tampon de rinçage (Tris-HCl pH 8 20mM ; NaCl 10mM ; EGTA 0,2mM ; NaF 0,2mM ; désoxycholate de sodium 0,2% ; NP40 0,5% et mélange d'inhibiteurs de protéases). Les protéines sont finalement éluées avec du tampon Laemmli (Sigma). Les lysats totaux et les fractions immunoprécipitées sont ensuite analysés par immunoblot.

VII. FRACTIONNEMENT

1. SEPARATION DES FRACTIONS SOLUBLES ET INSOLUBLES

Les cellules HeLa sontensemencées à raison de 4.10^6 cellules dans des boîtes de 10 cm de diamètre la veille de la transfection. Pour séparer les fractions solubles des fractions insolubles, le protocole déjà décrit dans la littérature a été suivi (Garcia-Mata et al., 1999) : 24h après la transfection les cellules sont lysées en tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8 ; NaCl 150mM ; NP40 1%, désoxycholate de sodium 0,5% ; SDS 0,1% et mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases [Roche]) pendant 30 min à 4°C. Les lysats sont passés 10 fois dans une aiguille de 27G. Après centrifugation à 14000 rotations par minute (rpm) pendant 15min à 4°C, le surnageant constitue la fraction soluble alors que le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*) avec 1% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) puis soniqué pour former la fraction insoluble. La fraction soluble et la fraction insoluble sont diluées dans du tampon Laemmli (Sigma) puis analysées par immunoblot.

2. SEPARATION EN 3 FRACTIONS

Les cellules HeLa sontensemencées à raison de 4.10^6 cellules dans des boîtes de 10 cm de diamètre la veille de la transfection. Pour séparer les fractions cytosolique (C), intermédiaire (I) et nucléaire (N), le protocole déjà décrit dans la littérature a été suivi (Kfoury et al., 2008) : 24h après la transfection les cellules sont lysées dans un tampon A (HEPES PH=7.9 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 1.5mM, DTT 1mM et mélange

d'inhibiteurs de protéases) pendant 10min à 4°C sous agitation. Après centrifugation à 400g pendant 10min à 4°C, le surnageant constitue la fraction cytosolique alors que le culot est lavé 3 fois dans un tampon de lavage (Tris PH=7.4 20mM, NaCl 100mM, Triton 1%, désoxycholate de sodium 0.5%, SDS 0,05% et mélange d'inhibiteurs de protéases) puis centrifugé à 400g pendant 10min à 4°C. Les surnageants sont rassemblés pour former la fraction intermédiaire. Le culot est lysé dans un tampon de lyse (Tris PH=7.5 50mM, NaCl 150mM, NP-40 0.5%, Triton 0.5% et mélange d'inhibiteurs de protéases) puis passé 5 fois dans une aiguille de 21G et vortexé pendant 30min à 4°C. Après centrifugation à 14000rpm pendant 20min, le surnageant constitue la fraction nucléaire. Les 3 fractions sont diluées en tampon Laemmli (Sigma) et analysées en immunoblot.

VIII. IMMUNOBLOT ET QUANTIFICATION

Les lysats et différentes fractions purifiées mélangés au Laemmli sont chauffés 5min à 100°C puis les protéines sont déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (Acrylamide/Bis-Acrylamide 10%) avant d'être transférées sur membrane de nitrocellulose (Optitran, Merck). Après migration et transfert, les membranes sont saturées en TBS (*Tris-Buffered Saline*)/5% lait. Les incubations avec les anticorps primaires et secondaires sont réalisées dans du TBS/5% lait/0,01% Tween. La révélation des protéines est effectuée par chimioluminescence à l'aide des kits Luminol (Sigma) ou ECL⁺ (GE Healthcare) sur des films autoradiographiques.

La quantification des signaux est réalisée, à partir de films peu exposés scannés, à l'aide du logiciel ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Le signal de la piste « Contrôle » est également mesuré pour estimer le bruit de fond et le soustrait du signal des autres pistes. Pour établir les différents pourcentages présentés dans nos résultats, nous avons procédé de la façon suivante :

- Pour établir la proportion de protéines Tax modifiées dans les cellules, la quantité totale de protéines présentes dans les cellules est estimée en ajoutant le signal de la bande de Tax non-conjuguée à 40 kDa et le signal des bandes de plus haut poids moléculaire toujours après soustraction du bruit de fond. Le signal mesuré des bandes de haut poids moléculaire (>40 kDa) est ensuite rapporté à la quantité totale de Tax pour obtenir une estimation de la proportion de Tax modifié dans les cellules.

- Pour établir le pourcentage d'ubiquitinylation ou de SUMOylation de Tax, les signaux mesurés sur le panneau ubiquitine ou SUMO sont, après soustraction du bruit de fond, normalisés sur la quantité de Tax non conjugué mesurée sur le panneau Tax. L'ubiquitinylation ou la SUMOylation est fixée à 100% avec Tax sauvage.
- Pour établir le pourcentage de IKK phosphorylé dans la fraction immunoprécipitée, le signal des deux bandes de IKK α et IKK β phosphorylé est mesuré et normalisé sur la quantité de Tax immunoprécipité.

IX. TEST DE TRANSACTIVATION DE PROMOTEUR

Ce test est réalisé en double dans des plaques de culture 24 puits à raison de 3.10^4 cellules HeLa ou 293T, 4.10^5 cellules T Jurkat ou CEM et $2,5.10^6$ lymphocytes T CD4+ primaires par puits. Les cellules sont co-transfectées avec une construction p κ B-Luc ou pLTR-Luc, codant la luciférase de luciole (*Firefly* luciférase) sous contrôle d'un promoteur dépendant de NF- κ B ou CREB respectivement, et une construction pRL-TK, codant la luciférase de méduse (*Renilla* luciférase) sous contrôle du promoteur de la thymidine kinase (TK) activé de façon constitutive dans les cellules. 24h ou 48h après la transfection, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée grâce au kit Dual Luciferase Assay System (Promega) et un luminomètre. Les enzymes *Firefly* et *Renilla* diffèrent par le type de substrat et le rayonnement émis : la réaction catalysée par la *Firefly* produit un spectre d'émission entre le vert et le jaune (550 à 570 nm) alors que dans le cas de la *Renilla*, une lumière bleue à 480 nm est émise. L'activité luciférase *Renilla* reflète la transcription de base dans les cellules considérées comme équivalente quelles que soit les conditions. Elle permet donc de normaliser l'activité *Firefly* pour l'affranchir des éventuelles variations dues à des différences de nombre de cellules transfectées et lysées analysées. Les variations observées du ratio « activité luciférase *Firefly* / activité luciférase *Renilla* » peuvent donc être interprétées comme des différences d'induction des différentes voies contrôlant le promoteur. Pour chaque expérience, les transfections sont réalisées en double. Le ratio d'un des deux points transfectés avec le vecteur vide est fixé à 1 et tous les autres ratios sont exprimés en fonction de cette activité basale du promoteur à éléments de réponse κ B ou CRE. Nous mesurons ainsi l'induction de ce promoteur dans les différentes conditions.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Student t et les résultats ont été considérés comme non significatifs lorsque les valeurs de la P-value étaient supérieures à 0,05 ($p > 0,05$).

X. IMMUNOFLUORESCENCE

Les cellules HeLa ou 293T sontensemencées sur des lamelles de verres à raison de $3 \cdot 10^4$ cellules dans un puits de plaque 24 puits la veille de la transfection et le marquage est réalisé 24h après la transfection. Les cellules en suspension, cellules T CEM ou cellules infectées par le virus HTLV-1 C8166 ou HUT-102, sont lavées une fois en PBS et déposées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine pendant 1h à 37°C dans du milieu RPMI 1640, à raison de $8 \cdot 10^5$ cellules par lamelle. La poly-L-lysine, composé chargé positivement, favorise les interactions électrostatiques avec les charges négatives des phospholipides des membranes cellulaires et donc l'adhérence des cellules sur les lamelles.

Les lamelles portant les cellules adhérentes ou les cellules en suspension sont lavées 2 fois avec du PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 15min avant d'être de nouveau lavées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du méthanol froid pendant 5min et de nouveau lavées avec du PBS 2 fois. La saturation est effectuée en incubant les cellules avec une solution de PBS contenant 2% d'albumine de sérum de bœuf (BSA) (Sigma) et 0,1% de Tween20 (Sigma) pendant 30min. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps primaire puis un anticorps secondaire dilué dans une solution de PBS contenant 2% de BSA et 0,1% de Tween20 pendant 1h et 45min respectivement. Pour un double marquage, ces deux étapes sont répétées. Entre chaque anticorps, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS-Tween20 0,1% pendant 5min. Les cellules sont ensuite incubées avec du DAPI (Sigma) dilué dans du PBS pendant 15min avant d'être lavées 2 fois avec du PBS. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames en utilisant le liquide de montage FluorSave Reagent (Calbiochem).

Les cellules ont été observées en microscopie confocale sur un microscope Leica TCS scanner multi-photon (spinning disc) avec un objectif 63X. L'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel Metamorph et les analyses d'images avec le logiciel Image-J (Wayne Rasband, NIH).

RESULTATS

I. RESULTATS NON PUBLIES : LES PROTEINES TRAF, DES REGULATEURS POTENTIELS DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

Afin d'identifier les ubiquitines ligases responsables de l'ubiquitylation de Tax, nous avons testé la capacité de différentes protéines TRAF à moduler l'ubiquitylation de Tax. Pour observer l'ubiquitylation de Tax, un plasmide codant la protéine Tax, fusionnée dans sa partie C-terminale à une étiquette de six histidines (Tax-His), est transfecté dans des cellules 293T. Les protéines Tax-His peuvent ensuite être purifiées, à partir des lysats cellulaires, grâce à une précipitation sur résine de nickel dans des conditions très stringentes (guanidine 6M). Ainsi, seules les protéines liées covalamment, dont l'ubiquitine, restent associées à Tax. La séparation des protéines précipitées par SDS-PAGE, puis leur marquage avec un anticorps anti-ubiquitine, permet de mettre en évidence les protéines Tax ubiquitylées de façon endogène.

A. TRAF5, UN REGULATEUR POSITIF DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

TRAF5 est une ubiquitine ligase impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B à partir du récepteur au TNF. Nous avons commencé par analyser l'effet de la surexpression de TRAF5 sur l'ubiquitylation de Tax-His dans des cellules 293T. Après purification sur résine de nickel, l'immunomarquage avec un anticorps anti-ubiquitine a permis de détecter des formes de haut poids moléculaires uniquement lorsque Tax est exprimé dans les cellules (**Figure 56A**, piste 2 comparée à piste 1). De plus, l'immuno-révélation avec un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 permet de confirmer la purification de Tax dans les cellules où la protéine était exprimée, et de façon équivalente. En absence de Tax transfecté, aucun signal n'est détecté ni avec l'anticorps anti-ubiquitine, ni avec le mélange de sérums de patients (**Figure 56A**, piste 1). La purification sur résine de nickel permet donc bien la détection spécifique des protéines Tax et les signaux ubiquitine observés correspondent à Tax conjugué à l'ubiquitine endogène des cellules. La quantité de Tax conjugué à l'ubiquitine peut être mesurée sur le panneau ubiquitine et est normalisée par rapport à la quantité de Tax purifié sur la résine de nickel observé sous sa forme non conjuguée sur le panneau Tax. Lorsque TRAF5 est surexprimé dans les cellules, cette ubiquitylation est augmentée d'environ 2,5 fois suggérant que TRAF5 favorise l'ubiquitylation de Tax (**Figure 56A**, piste 3). Au contraire, lorsque l'expression de TRAF5 est diminuée grâce à l'utilisation de siARN,

l'ubiquitinylation de Tax diminue fortement (**Figure 56B**). Ainsi, la présence de TRAF5 est en partie nécessaire à la bonne ubiquitinylation de Tax dans les cellules 293T. TRAF5 pourrait donc être une ubiquitine ligase qui coopère avec Ubc13 pour ubiquitinyler Tax.

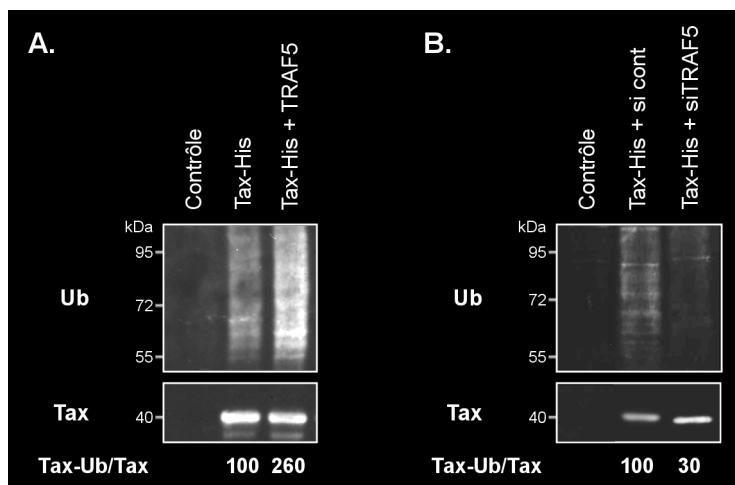


FIGURE 56 : TRAF5, UN REGULATEUR POSITIF DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His. Un plasmide codant la protéine myc-TRAF5 a également été co-transfecté ou non. Dans toutes les conditions, la même quantité d'ADN a été transfectée.

B. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax-His et des siARN contrôles ou dirigés contre l'ARNm codant la protéine TRAF5 (50nM).

A. et B. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine ou un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitinylation de Tax exprimé seul est fixée à 100%.

B. TRAF2 ET TRAF1, DES REGULATEURS NEGATIFS DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

1. TRAF2, UN RÉGULATEUR NÉGATIF INATTENDU

Les protéines TRAF2 et TRAF5 sont connues pour avoir des fonctions équivalentes voire redondantes dans l'activation de la voie NF- κ B. Nous avons donc voulu savoir si TRAF2 avait le même effet que TRAF5 sur l'ubiquitinylation de Tax. Nous avons donc réalisé des purifications sur résine de nickel comme décrit précédemment. De manière inattendue, la surexpression de TRAF2 dans les cellules 293T n'augmente pas l'ubiquitinylation endogène de Tax comme le fait TRAF5, mais au contraire la diminue d'environ un facteur 2 (**Figure 57A**). La transfection de siARN TRAF2 dans les cellules n'a par contre que peu d'effet et n'augmente que légèrement la proportion de Tax ubiquitinylé dans les cellules (**Figure 57B**). Ainsi, alors que TRAF2 est connue pour son activité ubiquitine ligase, l'effet est inverse sur la

protéine Tax puisque TRAF2 a un effet inhibiteur sur l'ubiquitinylation de Tax. Cependant, cet effet inhibiteur semble essentiellement induit par la surexpression de TRAF2 alors que la protéine TRAF2 endogène semble n'avoir que peu d'influence sur l'ubiquitinylation de Tax.

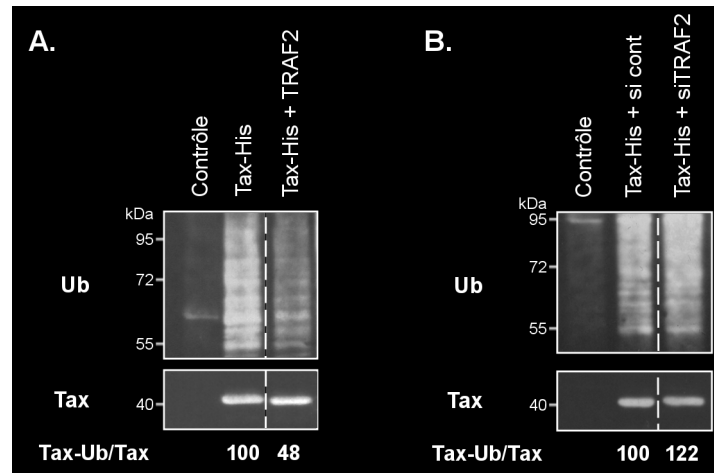


FIGURE 57 : TRAF2, UN REGULATEUR NEGATIF DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His. Un plasmide codant la protéine Flag-TRAF2 a également été co-transfecté ou non. Dans toutes les conditions, la même quantité d'ADN a été transfectée.

B. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax-His et des siARN contrôles ou dirigés contre l'ARNm codant la protéine TRAF2 (50nM).

A. et B. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine ou un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitinylation de Tax exprimé seul est fixée à 100%. Les pointillés séparent deux pistes qui ne sont pas contiguës sur un même gel.

Pour essayer de comprendre comment TRAF2 pouvait inhiber l'ubiquitinylation de Tax, nous nous sommes intéressés à l'effet de la protéine TRAF1.

2. TRAF1 ET TRAF2 COOPERENT POUR INHIBER L'UBIQUITINYLATION DE TAX

La protéine TRAF1 ne possède pas de domaine RING et donc pas d'activité ubiquitine ligase (**Figure 55**). Elle pourrait donc jouer le rôle de dominant négatif en s'associant à TRAF2. De plus, une étude a montré que des oligomères de TRAF1 et TRAF2 pouvaient recruter la déubiquitinase A20 et inhiber ainsi l'activation de la voie NF- κ B par le TNF (Song et al., 1996). Nous avons donc fait l'hypothèse que TRAF1 pouvait participer à l'inhibition de l'ubiquitinylation de Tax.

En procédant comme avec TRAF5 et TRAF2, nous avons analysé le profil d'ubiquitylation de Tax en présence de TRAF1 surexprimé ou de siARN TRAF1 (**Figure 58**). La surexpression de TRAF1 seule réduit effectivement l'ubiquitylation de Tax mais de façon modérée (35%) (**Figure 58A**). Au contraire, la diminution de l'expression de TRAF1 par ARN interférence augmente l'ubiquitylation de Tax (35%) (**Figure 58B**). Ceci suggère que TRAF1 est requis pour inhiber l'ubiquitylation de Tax mais n'est pas suffisant. Ce résultat corrobore donc notre hypothèse d'une coopération entre TRAF2 et TRAF1 pour bloquer l'ubiquitylation de Tax.

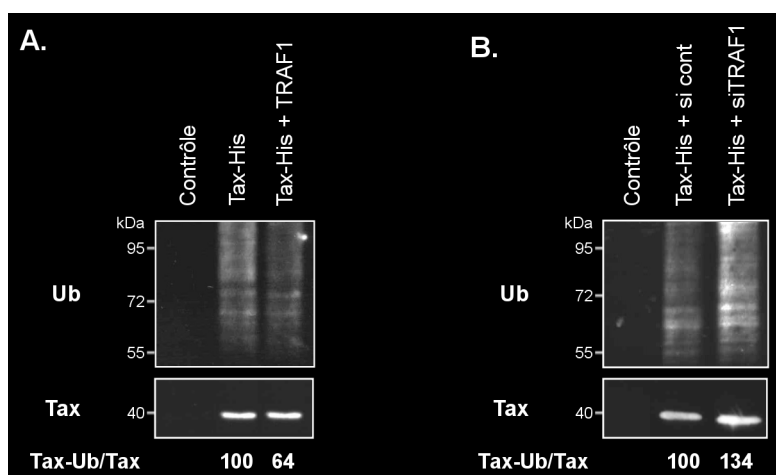


FIGURE 58 : TRAF1, UN AUTRE REGULATEUR NEGATIF DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His. Un plasmide codant la protéine Flag-TRAF1 a également été co-transfecté ou non. Dans toutes les conditions, la même quantité d'ADN a été transfectée.

B. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax-His et des siARN contrôles ou dirigés contre l'ARNm codant la protéine TRAF1 (50nM).

A. et B. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine ou un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitylation de Tax exprimé seul est fixée à 100%.

Afin de valider notre hypothèse, nous avons surexprimé dans les mêmes cellules 293T TRAF1 et TRAF2 et analysé le profil d'ubiquitylation de Tax dans ces cellules. Comme observé précédemment, la surexpression de TRAF2 diminue l'ubiquitylation de Tax mais cette diminution est beaucoup plus importante lorsque les deux protéines TRAF2 et TRAF1 sont surexprimées (**Figure 59**). Ainsi, TRAF2 et TRAF1 inhibent de façon synergique l'ubiquitylation de Tax.

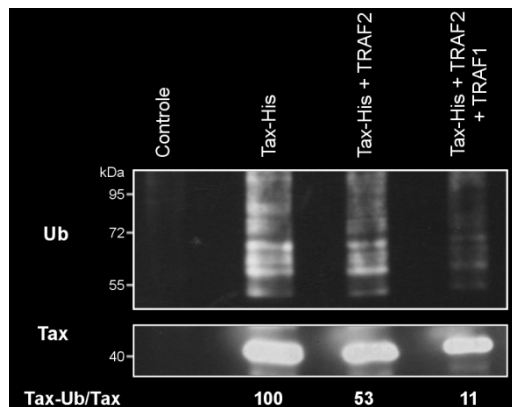


FIGURE 59 : TRAF2 ET TRAF1 COOPÈRENT POUR INHIBER L'UBIQUITINYLATION DE TAX

Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His. Des plasmides codant la protéine Flag-TRAF2 et Flag-TRAF1 ont également été co-transfectés comme indiqué. Dans toutes les conditions, la même quantité d'ADN a été transfectée. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine ou un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitinylation de Tax exprimé seul est fixée à 100%.

Tous ces résultats démontrent que les protéines TRAF peuvent effectivement réguler l'ubiquitinylation de Tax. La protéine TRAF5 favorise son ubiquitinylation alors qu'au contraire les protéines TRAF1 et TRAF2 coopèrent pour l'inhiber, surtout lorsqu'elles sont surexprimées.

C. LES PROTEINES TRAF ET L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

Nous avons ensuite voulu savoir si l'effet des protéines TRAF sur l'ubiquitinylation de Tax avait des répercussions sur la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B. Pour cela, nous avons réalisé un test de transactivation de promoteur à éléments de réponse κ B. Pour cela, des cellules T Jurkat ont été co-transfectées avec deux constructions, κ B-Luc et pRL-TK. Comme tous les points de l'expérience sont réalisés en double, l'activité luciférase basale dans les cellules contrôles est fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Lorsque les cellules expriment la protéine Tax, l'activité luciférase relative augmente fortement par rapport aux cellules contrôles transfectées avec un vecteur vide (**Figure 60**). Ceci est cohérent avec ce que nous savons de la protéine Tax qui est un activateur reconnu de la voie NF- κ B. En revanche, Tax-M22 est un mutant de Tax dont la caractéristique est de ne pas activer la voie NF- κ B alors que le mutant Tax-M47 au contraire active très bien la voie NF- κ B (**Figure 60**). Ces deux mutants ont été caractérisés et sont donc intégrés à chaque test de transactivation comme témoins (Smith and Greene, 1990).

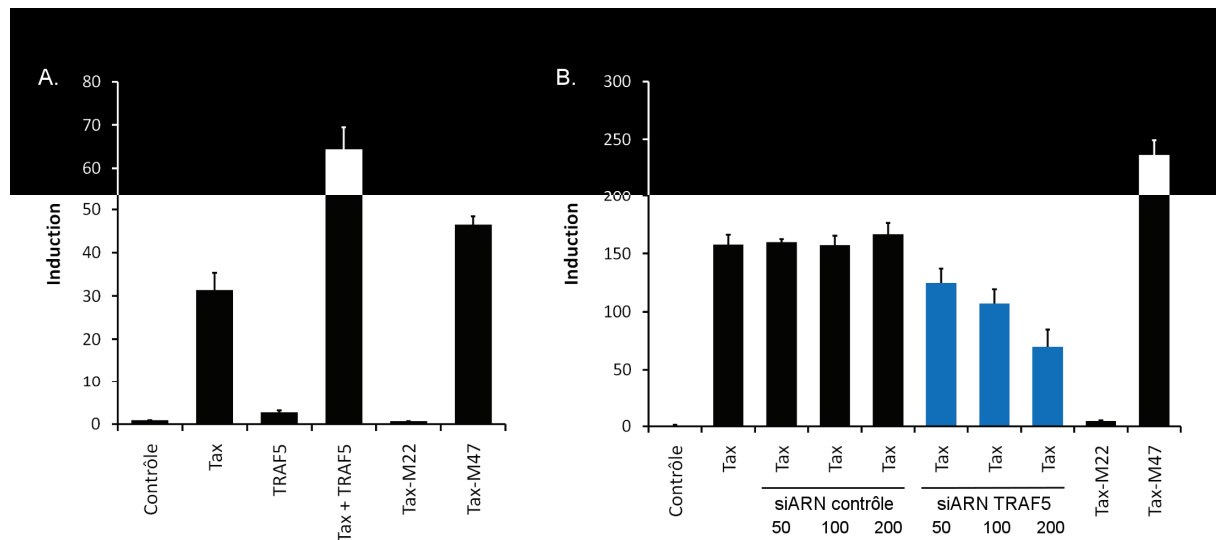


FIGURE 60 : TRAF5 FAVORISE L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX

A et B. Des cellules T Jurkat sont co-transfectées avec une construction κ B-Luc et une construction pRL-TK. Les cellules sont également transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax ou les mutants Tax-M22 et M47. 24h après la transfection, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés.

A. Les cellules sont également transfectées avec Flag-TRAF5 en présence ou en absence de Tax. Les moyennes et erreurs types de la moyenne (SEM, *Standard Error of the Mean*) de 2 expériences indépendantes sont représentées.

B. Des siARN contrôles ou dirigés contre TRAF5 sont également transfectés en concentration croissante (50, 100 et 200nM) dans les cellules. Les moyennes et SEM de 2 expériences indépendantes sont représentées.

Lorsque TRAF5 est surexprimé dans les cellules, la capacité de Tax à activer la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B est augmentée alors que TRAF5 n'a qu'un très léger effet activateur sur la voie NF- κ B en absence de Tax (**Figure 60A**). De façon intéressante, TRAF5 augmente la capacité transactivatrice de Tax d'un facteur environ 2,5, tout comme l'augmentation de l'ubiquitinylation de Tax. De façon inverse, la suppression de l'expression de TRAF5 par ARN interférence diminue la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B (**Figure 60B**). En transfectant des quantités croissantes de siARN dans les cellules, nous avons pu mettre en évidence que l'effet inhibiteur de la diminution de l'expression de TRAF5 est dépendant de la dose, confirmant le rôle de la protéine TRAF5 dans la capacité de Tax à activer la voie NF- κ B. Les siARN contrôles n'ont par contre aucun effet sur la transactivation des promoteurs par Tax, même à forte dose. Ainsi, la diminution de l'activité luciférase est effectivement due à la perte de TRAF5 et non à une toxicité non spécifique des siARN.

L'effet de TRAF5 semble clair sur l'activation de la voie NF- κ B par Tax mais les résultats obtenus en présence de TRAF2 surexprimé compliquent notre interprétation.

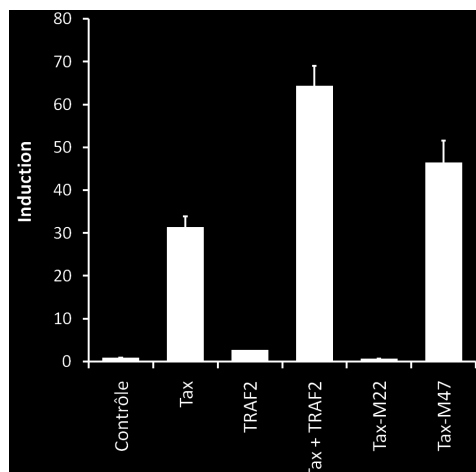


FIGURE 61 : EFFET DE TRAF2 SUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB

Des cellules T Jurkat sont co-transfectées avec une construction κB -Luc et une construction pRL-TK. Les cellules sont également transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax et/ou Flag-TRAF2 ou les mutants Tax-M22 et M47. 24h après la transfection, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et erreurs types de la moyenne (SEM, *Standard Error of the Mean*) de 2 expériences indépendantes sont représentées.

Alors que la protéine TRAF2 n'active pas la voie NF- κB seule, elle augmente l'induction de la transactivation du promoteur à éléments de réponse κB par la protéine Tax (**Figure 61**). Ainsi, les protéines TRAF5 et TRAF2, bien qu'ayant des effets opposés sur l'ubiquitinylation de Tax, ont un même effet activateur sur la voie NF- κB . Les protéines TRAF étant des protéines connues de la voie d'activation de NF- κB , il est donc possible que l'effet observé dans nos essais de transactivation de promoteurs soit indirect et dissocié de l'état d'ubiquitinylation de Tax.

Ainsi, même si l'ensemble de nos résultats suggère que la protéine TRAF5 est une ubiquitine ligase au moins partiellement impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax et que ce rôle peut être important pour permettre à Tax d'activer la voie NF- κB , il est encore nécessaire de le confirmer au vu de nos résultats avec la protéine TRAF2. Comprendre par quel mécanisme TRAF2 et TRAF1 diminuent l'ubiquitinylation de Tax pourrait nous permettre de résoudre le paradoxe de l'augmentation par TRAF2 de l'activation de la voie NF- κB induite par Tax.

D. UN MOTIF POTENTIEL D'INTERACTION AVEC LES PROTEINES TRAF

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui permettent aux protéines TRAF d'agir sur la conjugaison de l'ubiquitine à la protéine Tax, nous nous sommes demandé si les

protéines TRAF pouvaient interagir directement avec Tax. Un argument en faveur d'une telle interaction a été l'identification dans la séquence de Tax d'un motif potentiel d'interaction avec les TRAF. En effet le motif présent entre les acides aminés 79 et 81 de Tax [PTQRT] correspond à l'un des motifs consensus décrits d'interaction avec TRAF2 [PxQxT] (Ye et al., 1999) (**Figure 62**). Nous avons fait l'hypothèse que ce motif pourrait permettre l'interaction de Tax avec les différentes protéines TRAF. Nous avons donc étudié l'interaction des protéines TRAF avec les protéines Tax sauvage mais également mutées dans ce motif potentiel d'interaction.

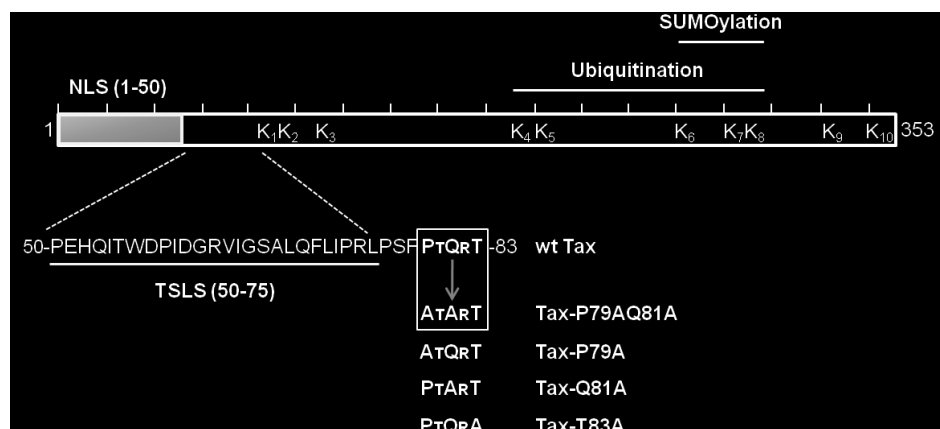


FIGURE 62 : LES MUTANTS DU MOTIF PxQxT DE TAX

Représentation schématique de la séquence de la protéine Tax. Les signaux de localisation nucléaire (NLS) et de localisation dans les corps nucléaires (TSLs) sont représentés. Les 10 lysines de Tax sont également présentées. Le motif PxQxT entre les acides aminés 79 et 83 est encadré et les différents mutants de ce motif sont indiqués.

Plusieurs mutants du motif PxQxT ont été générés au laboratoire. Chaque position a été remplacée par une alanine individuellement (Tax-P79A, Tax-Q81A et Tax-T83A). Un double mutant où les acides aminés P79 et Q81 ont été remplacés par des alanines a également été créé (**Figure 62**). Dans tout le reste de l'étude, l'utilisation du terme « Tax » sans précision de mutations désignera la protéine Tax sauvage.

Nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation en présence de la protéine Tax sauvage ou des protéines Tax mutées. Des cellules HeLa ont été transfectées avec des plasmides codant Flag-TRAF1 et/ou la protéine Tax. Nous avons ensuite immunoprécipité Flag-TRAF1 grâce à des anticorps dirigés contre l'étiquette Flag. L'immunomarquage des fractions précipitées permet ensuite de visualiser si Tax est présente dans ces fractions. La protéine Tax est effectivement co-immunoprécipitée avec TRAF1 (**Figure 63**, piste 4). Cette co-immunoprécipitation n'est observée que lorsque les deux partenaires sont transfectés dans les cellules (**Figure 63**, piste 4 versus 1 et 3). La

protéine Tax mutée sur les deux acides aminés P79 et Q81 est également co-immunoprécipitée avec TRAF1 et semble-t-il plus efficacement (**Figure 63**, piste 5). En effet, plus de Tax-P79AQ81A est détectée dans la fraction immunoprécipitée que de Tax sauvage alors que les deux protéines apparaissent exprimées de façon équivalente dans les lysats totaux des cellules.

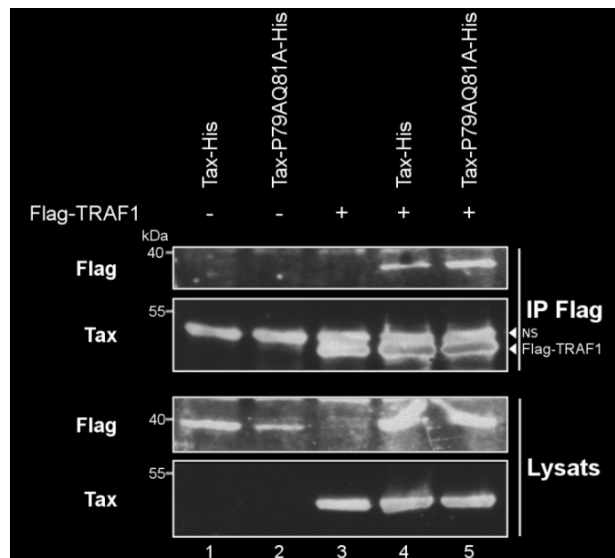


FIGURE 63 : CO-IMMUNOPRECIPITATION DE TAX ET TAX MUTE AVEC TRAF1

Des cellules HeLa sont co-transfectées avec des plasmides codant la protéine Flag-TRAF1 et ou la protéine Tax sauvage ou mutée dans le motif PxQxT comme indiqué. Après 24h, les cellules sont lysées et une partie du lysat est incubée avec des anticorps anti-Flag couplés à des billes d'agarose pour immunoprécipiter Flag-TRAF1. Les lysats totaux et la fraction immunoprécipitée (IP Flag) sont analysés par immunoblot avec des anticorps anti-Flag et le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1. NS : bande non spécifique.

Des résultats similaires ont été obtenus avec TRAF5 et TRAF2. Les protéines Tax mutées dans le motif PxQxT interagissent donc avec les protéines TRAF. Ce motif n'est donc pas requis pour cette interaction.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que les protéines TRAF peuvent être des régulateurs de l'ubiquitylation de Tax. Cependant, le motif PxQxT identifié comme un motif potentiel d'interaction avec les protéines TRAF n'est pas requis pour l'interaction de Tax avec les TRAF et il est nécessaire de chercher un autre mécanisme d'interaction des protéines TRAF avec la protéine Tax.

Malgré tout, les protéines Tax mutées dans le motif PxQxT se sont révélées avoir des caractéristiques très intéressantes pour l'étude du rôle des modifications post-traductionnelles de Tax.

II. LA SUMOYLATION ET LES CORPS NUCLEAIRES TAX NE SONT PAS NECESSAIRES POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B (ARTICLE 1)

A. LES PROTEINES TAX MUTEES DANS LE MOTIF PxQxT PRESENTENT DES DEFAUTS DE SUMOYLATION PLUS OU MOINS SEVERES

Bien que la mutation du motif PxQxT n'altère pas l'interaction de Tax avec les protéines TRAF, nous avons analysé les profils d'ubiquitinylation des différents mutants. Après transfection de cellules 293T, nous avons donc purifié les protéines Tax, sauvage et mutées sur les différentes positions du motif, sur une résine de nickel grâce à leur étiquette histidine. Nous avons ensuite révélé l'ubiquitinylation endogène de Tax, après immunoblot, grâce à un anticorps anti-ubiquitine. Après quantification des signaux ubiquitine et normalisation sur la quantité de Tax non conjugué purifié, le taux d'ubiquitinylation de Tax sauvage est fixé à 100%. Il s'est avéré que le mutant Tax-P79A-His présentait un taux d'ubiquitinylation très légèrement diminué comparé à Tax alors que Tax-Q81A-His est ubiquitinylé de manière équivalente à Tax. Au contraire, Tax-T83A-His et Tax-P79AQ81A-His sont légèrement plus ubiquitinylés que Tax (**Figure 64A**). De façon générale, tous les mutants sont donc ubiquitinylés dans des proportions équivalentes à Tax.

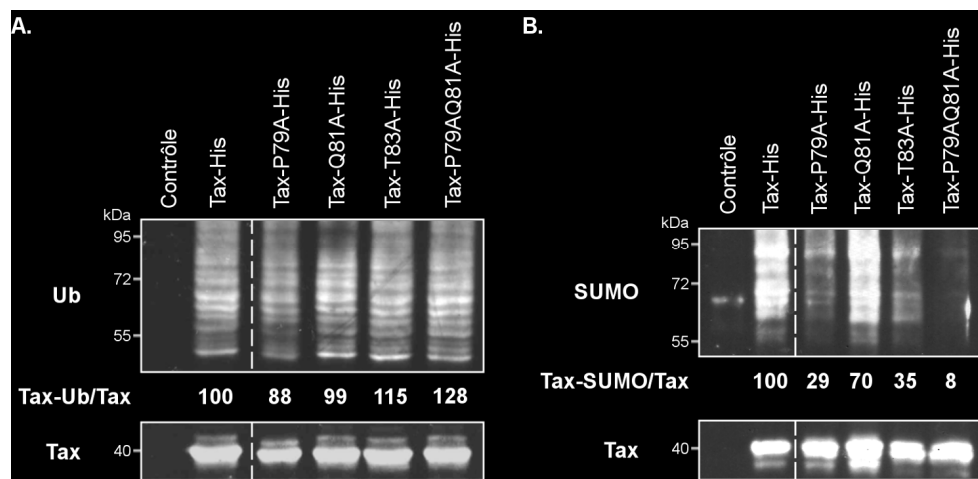


FIGURE 64 : UBIQUITINYLATION ET SUMOYLATION DES MUTANTS DE TAX DANS LE MOTIF PxQxT

A. et B. Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His sauvage ou mutée dans le motif PxQxT comme indiqué. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine (**A**) ou anti-SUMO2/3 (**B**) et un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation ou de la SUMOylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine ou SUMO est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax ou Tax-SUMO/Tax). L'ubiquitinylation de Tax sauvage est fixée à 100%. Les pointillés séparent deux pistes qui ne sont pas contiguës sur un même gel.

Grâce à la même technique de purification sur résine de nickel suivi d'un immunoblot des fractions purifiées, il est également possible d'analyser la conjugaison de protéines SUMO2/3 endogènes à Tax. Les différentes protéines Tax, sauvage ou mutées, ont donc été transfectées dans des cellules 293T. Après immunoblot et révélation avec un anticorps anti-SUMO2/3, des formes de haut poids moléculaires ont effectivement été visualisées uniquement lorsque la protéine Tax est présente dans les cellules. La purification permet donc bien d'observer la conjugaison endogène de la protéine Tax à des chaînes de SUMO2/3 (**Figure 64B**). Ces signaux SUMO sont également quantifiés et normalisés sur la quantité de Tax non conjugué purifié et la SUMOylation de Tax sauvage est fixée à 100%. Les protéines Tax mutées présentent des niveaux de SUMOylation très variables mais toujours inférieurs à Tax. Le mutant Tax-Q81A-His est le moins affecté puisqu'il présente encore 70% de SUMOylation par rapport à Tax. La SUMOylation des mutants Tax-P79A-His et Tax-T83A-His est par contre très réduite (d'environ 70%). Enfin, la SUMOylation du double mutant Tax-P79AQ81A-His est encore plus réduite (>90%). Comme attendu, ce mutant semble cumuler le défaut de SUMOylation de Tax-P79A et Tax-Q81A (**Figure 64B**).

Les mutants du motif PxQxT, alors qu'ils n'ont aucun défaut d'ubiquitinylation ou seulement très léger dans le cas de Tax-P79A, présentent donc des défauts de SUMOylation à des degrés variables. A ce titre, le double mutant Tax-P79AQ81A se révèle être un outil très intéressant car, contrairement aux mutants de lysines de Tax décrits jusqu'à présent, il n'est quasiment pas SUMOylé sans être affecté dans son ubiquitinylation. Ce mutant pourrait donc nous permettre d'approfondir le rôle de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B. Dans la suite de l'étude, nous avons donc décidé de nous consacrer à la caractérisation du double mutant Tax-P79AQ81A.

B. TAX-P79AQ81A ET L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B OU L'ABSENCE DE NECESSITE DE SUMOYLATION ET DE FORMATION DES CORPS NUCLEAIRES POUR ACTIVER CETTE VOIE

1. CARACTERISATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DU DOUBLE MUTANT TAX-P79AQ81A

Nous avons voulu confirmer les observations précédentes sur le mutant Tax-P79AQ81A dans un autre modèle cellulaire et également caractériser plus précisément les

modifications post-traductionnelles qui ciblent ou non ce mutant. Pour cela, nous avons utilisé une autre lignée de cellules adhérentes, les cellules HeLa. Les cellules sont transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant la protéine sauvage Tax-His ou mutée Tax-P79AQ81A-His, puis les protéines sont purifiées sur résine de nickel grâce à leur étiquette Histidine. Plusieurs anticorps sont utilisés pour visualiser les différentes modifications de Tax (**Figure 65 à 69**). Dans tous les cas, le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 permet de vérifier que les protéines Tax sauvage et mutée sont exprimées et purifiées en quantité équivalente. La quantification des différentes modifications de Tax est toujours normalisée sur la quantité de Tax non conjugué purifié.

Pour commencer, nous avons voulu estimer la proportion de Tax modifié dans les cellules. Une longue exposition d'un immunomarquage avec le mélange de sera de patients permet de visualiser des formes de Tax de haut poids moléculaires confirmant l'existence de formes modifiées de Tax dans les cellules (**Figure 65**). Ces formes modifiées représentent environ 40% et 50% des formes de Tax-His et Tax-P79AQ81A respectivement. Cette proportion a été obtenue en quantifiant le signal des formes de haut poids moléculaire (formes modifiées) et le signal de la forme non conjuguée de Tax. Le signal des formes modifiées a ensuite été rapporté à la quantité totale de Tax dans les cellules (formes modifiées + forme non conjuguée). La forme majoritaire de Tax modifié est une bande d'environ 48kDa qui correspond à la taille de Tax monoubiquitinylé.

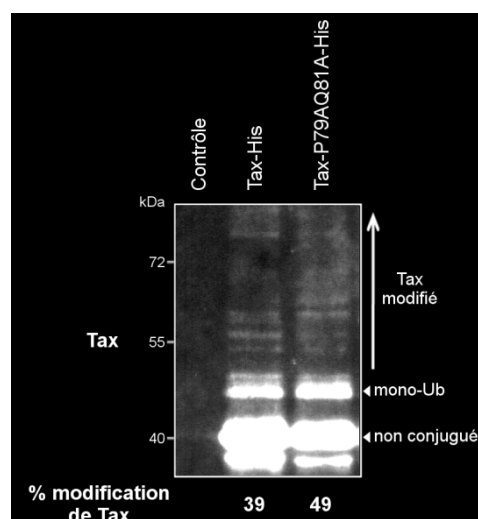


FIGURE 65 : POURCENTAGE DE MODIFICATION DE TAX SAUVAGE OU MUTE DANS LES CELLULES

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). Le pourcentage de modification des protéines Tax est obtenu en quantifiant le signal des formes de Tax modifié et monoubiquitinylé et en rapportant ce signal au signal total de la piste (Tax total).

Pour préciser la nature des modifications de Tax que l'on peut observer sur la **Figure 65**, nous avons ensuite analysé la conjugaison des chaînes d'ubiquitine sur les protéines Tax sauvage et muté. L'utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine nous a permis de valider le fait que le double mutant n'a pas de défaut d'ubiquitinylation et est au contraire plus ubiquitinylé que Tax (**Figure 66A**). Cependant, il existe plusieurs types de chaînes d'ubiquitine en fonction de la lysine de l'ubiquitine ciblée pour la conjugaison d'un nouveau monomère d'ubiquitine. Notamment la conjugaison de Tax aux chaînes K63 s'est révélée essentielle pour les fonctions de Tax et particulièrement pour l'activation de la voie NF- κ B. Nous avons donc vérifié que l'ubiquitinylation du mutant Tax-P79AQ81A observée correspondait bien à des chaînes K63. Tax-P79AQ81A-His est effectivement conjugué à des chaînes d'ubiquitine K63 de manière quasiment équivalente à Tax (**Figure 66B**). La double mutation dans le motif PxQxT de Tax n'affecte donc pas l'ubiquitinylation de la protéine en particulier par les chaînes K63 qui sont cruciales pour les fonctions activatrices de Tax.

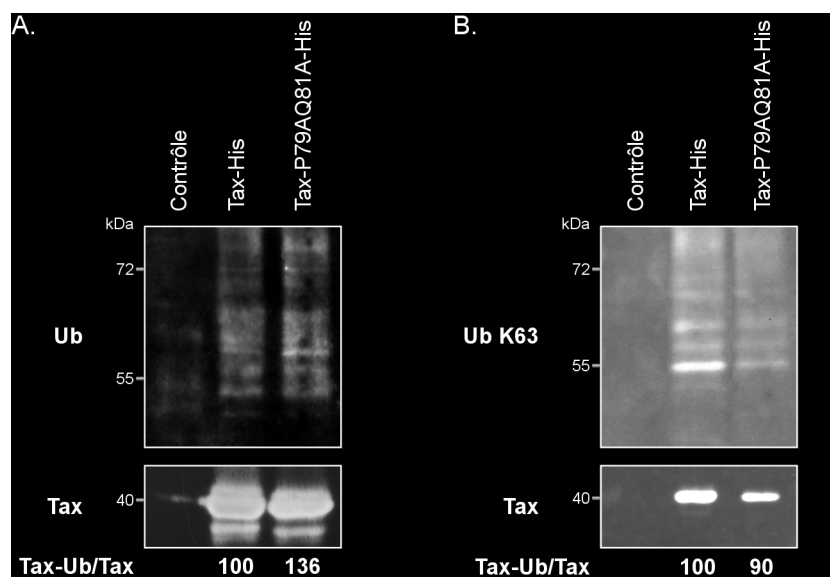


FIGURE 66 : CARACTERISATION DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX ET TAX-P79AQ81A

A. et B. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine (**A**) ou anti-chaînes d'ubiquitine liées en K63 (**B**) et un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation de Tax détectée sur les panneaux ubiquitine est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitinylation de Tax sauvage est fixée à 100%.

Nous avons également examiné la SUMOylation de Tax et du mutant dans les cellules HeLa. Tout d'abord, la conjugaison endogène aux protéines SUMO2/3 est obtenue en utilisant un anticorps anti-SUMO2/3 pour l'immunomarquage. Comme dans les cellules

293T, la SUMOylation de Tax-P79AQ81A-His est très réduite par rapport à Tax-His (de plus de 80%) (**Figure 67A**). Pour observer la conjugaison de Tax à SUMO1, comme cela avait été précédemment décrit, il est nécessaire de co-transfecter les cellules avec le plasmide codant la protéine Tax-His mais également une construction codant la protéine SUMO1 fusionnée à une étiquette HA (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Dans ces conditions, des formes de Tax conjuguées à deux ou trois protéines SUMO sont majoritairement obtenues (**Figure 67B**). Comme les protéines SUMO1 ne peuvent pas former de chaînes, ces formes de Tax di- ou tri-SUMO sont soit des protéines Tax conjuguées à 2 ou 3 protéines SUMO1 sur plusieurs lysines, soit des protéines SUMO1 à l'extrémité de chaînes de SUMO2/3 (Matic et al., 2008). Ces formes sont très réduites dans le cas de Tax-P79AQ81A-His. Le mutant Tax-P79AQ81A a donc un défaut sévère de conjugaison à la fois aux protéines SUMO2/3 et SUMO1 comparé à la protéine Tax sauvage.

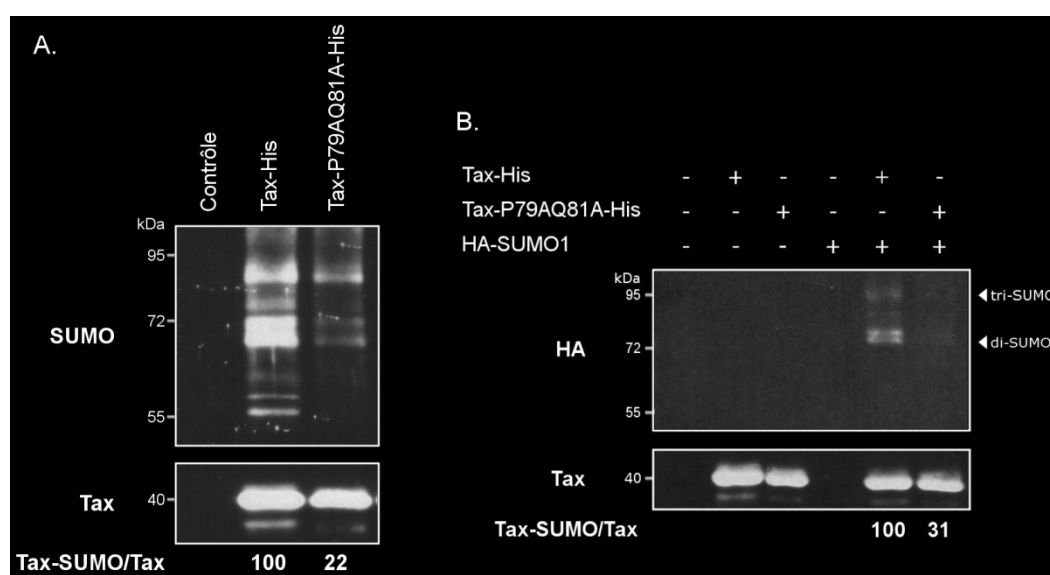


FIGURE 67 : CARACTERISATION DE LA SUMOYLATION DE TAX ET TAX-P79AQ81A

A. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His.

B. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His et une construction codant la protéine HA-SUMO1 comme indiqué.

A. et B. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-SUMO2/3 (**A**) ou anti-HA (**B**) et un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de la SUMOylation de Tax détectée sur les panneaux SUMO ou HA est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-SUMO/Tax). La SUMOylation de Tax sauvage est fixée à 100%.

L'ensemble de ces résultats confirment donc nos observations réalisées dans les cellules 293T mais permet également de les préciser. Le double mutant Tax-P79AQ81A n'est

en effet pas affecté dans son ubiquitinylation, y compris dans la conjugaison aux chaînes K63, alors qu'il présente une très forte diminution de sa conjugaison à SUMO2/3 mais également à SUMO1.

2. CARACTERISATION DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TAX-P79AQ81A : UN DEFAUT DE FORMATION DES CORPS NUCLEAIRES

La localisation subcellulaire de la protéine Tax est associée à ses modifications post-traductionnelles et à sa fonction. Pour observer cette localisation, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence dans des cellules HeLa.

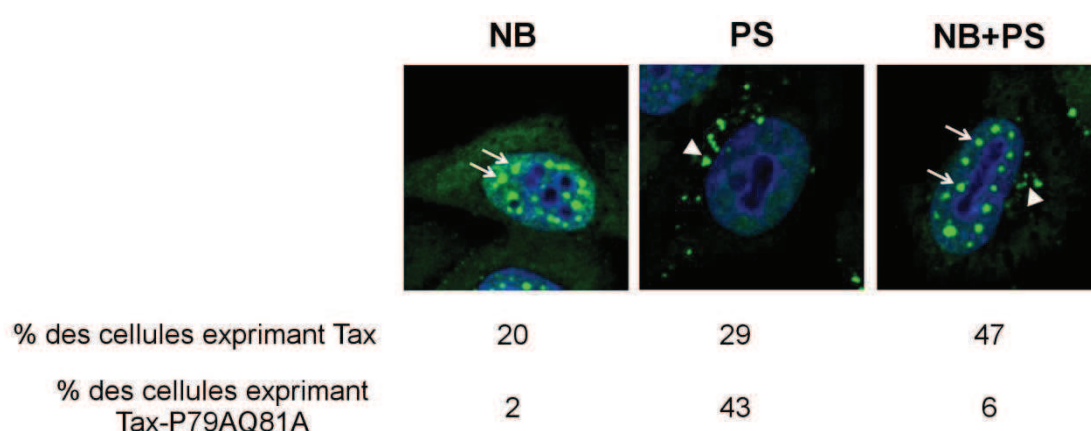


FIGURE 68 : LOCALISATIONS SUBCELLULAIRES CARACTERISTIQUES DE LA PROTEINE TAX

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax-His. 24h après la transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax (vert). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules sont ensuite observées en microscopie confocale. Des cellules présentant l'un des 3 types de localisation subcellulaire de Tax sont présentées : uniquement dans les corps nucléaires (NB), uniquement dans les agrégats périnucléaires (PS) ou dans les deux (NB+PS). Les flèches désignent des corps nucléaires alors que les têtes de flèche désignent les agrégats périnucléaires. La proportion de cellules exprimant la protéine Tax ou Tax-P79AQ81A présentant chacun des phénotypes est indiquée sous chaque photographie. Plus de 200 cellules ont été analysées pour chaque protéine Tax.

24h après la transfection avec un plasmide codant la protéine Tax-His, les cellules sont fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax. L'observation en microscopie confocale nous permet de visualiser un marquage diffus dans toutes les cellules, que ce soit dans le noyau ou dans le cytoplasme. Mais la protéine Tax se concentre également dans des spots intenses dans le noyau, les corps nucléaires (NB, *nuclear bodies*) et dans des spots en périphérie du noyau, les agrégats périnucléaires (PS, *perinuclear spots*). Nous avons donc distingué 3 types de phénotypes dans les cellules HeLa, une cellule représentative de chaque étant présentée sur la **Figure 68** : la présence de Tax uniquement

dans les corps nucléaires, uniquement dans les agrégats périnucléaires ou à la fois dans les corps nucléaires et dans les agrégats périnucléaires. La proportion de cellules présentant les différentes localisations subcellulaires a été estimée. Ainsi la protéine Tax sauvage forme uniquement des corps nucléaires dans 20% des cellules, des corps nucléaires associés à des agrégats périnucléaires dans 47% des cellules et des agrégats périnucléaires seuls sont dans 29% des cellules (**Figure 68**).

Le mutant Tax-P79AQ81A présente un défaut de SUMOylation. De plus, les mutations P79AQ81A sont situées juste après le motif TSLs de localisation dans les corps nucléaires (acides aminés 50 à 75) (Fryrear et al., 2009) (**Figure 62**). Nous avons donc cherché à savoir si la localisation subcellulaire du mutant Tax-P79AQ81A, en particulier dans les corps nucléaires, était affectée. Pour cela, nous avons comparé, grâce à des expériences d'immunofluorescence, la proportion de cellules exprimant Tax ou Tax-P79AQ81A présentant des corps nucléaires. Nous avons d'abord réalisé ces expériences sur des cellules adhérentes, HeLa ou 293T. Les cellules, transfectées avec une construction contrôle ou codant les protéines Tax ou Tax-P79AQ81A, sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax et observées au microscope confocal. Dans les cellules HeLa, seul un très léger marquage non spécifique est visible sur les cellules contrôles transfectées avec un plasmide vide confirmant que le fort marquage observé dans les cellules transfectées par des plasmides Tax est bien spécifique de cette protéine (**Figure 69A**, ligne 1 comparée aux lignes 2 et 3). Comme décrit précédemment, les cellules exprimant Tax sauvage présentent un fort marquage dans le noyau et autour du noyau sous forme de spots. Tax forme en effet des corps nucléaires dans une large majorité de cellules (67%) (**Figure 69A**, ligne 2). Au contraire, la protéine Tax-P79A81A est très déficiente dans la formation des corps nucléaires. Seules 8% des cellules exprimant ce mutant comptent en effet un ou deux spots dans le noyau, quand la protéine Tax sauvage en forme une dizaine, et ceux-ci apparaissent beaucoup plus petits que ceux formés par Tax (**Figure 69A**, ligne 3). Pourtant, Tax-P79AQ81A est toujours capable de former des agrégats périnucléaires comme il est possible de le voir sur les images de la **Figure 69A**. En effet, si nous quantifions la répartition des cellules exprimant Tax-P79AQ81A entre les 3 phénotypes décrits sur la **Figure 68**, 43% des cellules présentent des agrégats périnucléaires seuls contre 29% des cellules exprimant Tax. Les immunomarquages sur cellules 293T donnent les mêmes résultats avec 69% des cellules exprimant Tax sauvage

qui forment des corps nucléaires contre seulement 5% des cellules exprimant la protéine Tax mutée (**Figure 69B**).

Dans les cellules HeLa et 293T, la protéine Tax mutée dans le motif PxQxT associe donc un défaut sévère de SUMOylation et de formation des corps nucléaires, confirmant le lien précédemment décrit entre ces deux processus.

Le virus HTLV-1 infecte préférentiellement les lymphocytes T. Pour nous rapprocher d'un modèle plus physiologique, nous avons donc mené nos observations dans des cellules T de la lignée CEM. De la même façon que dans les cellules adhérentes, les cellules transfectées avec un plasmide vide permettent de déterminer l'intensité du marquage non spécifique et valider le marquage observé sur les cellules transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax ou Tax-P79AQ81A (**Figure 69C**, ligne 1 comparée aux lignes 2 et 3). Les cellules T ont un cytoplasme très restreint comparé aux cellules adhérentes, ce qui rend difficile l'observation des agrégats périnucléaires. Par contre, les corps nucléaires sont parfaitement visibles dans le noyau des cellules exprimant la protéine Tax et plus précisément dans 78% d'entre elles (**Figure 69C**, ligne 2). Dans les cellules T aussi, Tax-P79AQ81A présente un défaut très important de formation des corps nucléaires puisque seuls 9% des cellules exprimant cette protéine présentent un ou deux petits spots dans le noyau (**Figure 69C**, ligne 3).

La protéine Tax mutée dans le motif P79AQ81A, en plus de son défaut de SUMOylation, est donc déficiente dans la formation des corps nucléaires aussi bien dans les cellules adhérentes que dans les lymphocytes T. Or ces deux propriétés de Tax ont été décrites comme essentielles pour l'activation de la voie NF- κ B. Il nous a donc paru nécessaire d'étudier les capacités de Tax-P79AQ81A à activer cette voie.

Figure 69 : Localisation subcellulaire de Tax et Tax-P79AQ81A

A. et B. Des cellules HeLa (**A**) ou 293T (**B**), cultivées sur lamelles de verre, ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His. 24h après la transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax (vert). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu).

C. Des cellules CEM ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His. 24h après la transfection, les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax (vert). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu).

A., B. et C. Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules présentant des corps nucléaires ont été dénombrées. En rapportant ce nombre à celui des cellules positives pour le marquage Tax on obtient le pourcentage de cellules dans lesquelles Tax forment des corps nucléaires. Ce pourcentage est indiqué à droite des images. Au moins 100 cellules ont été analysées dans chaque condition.

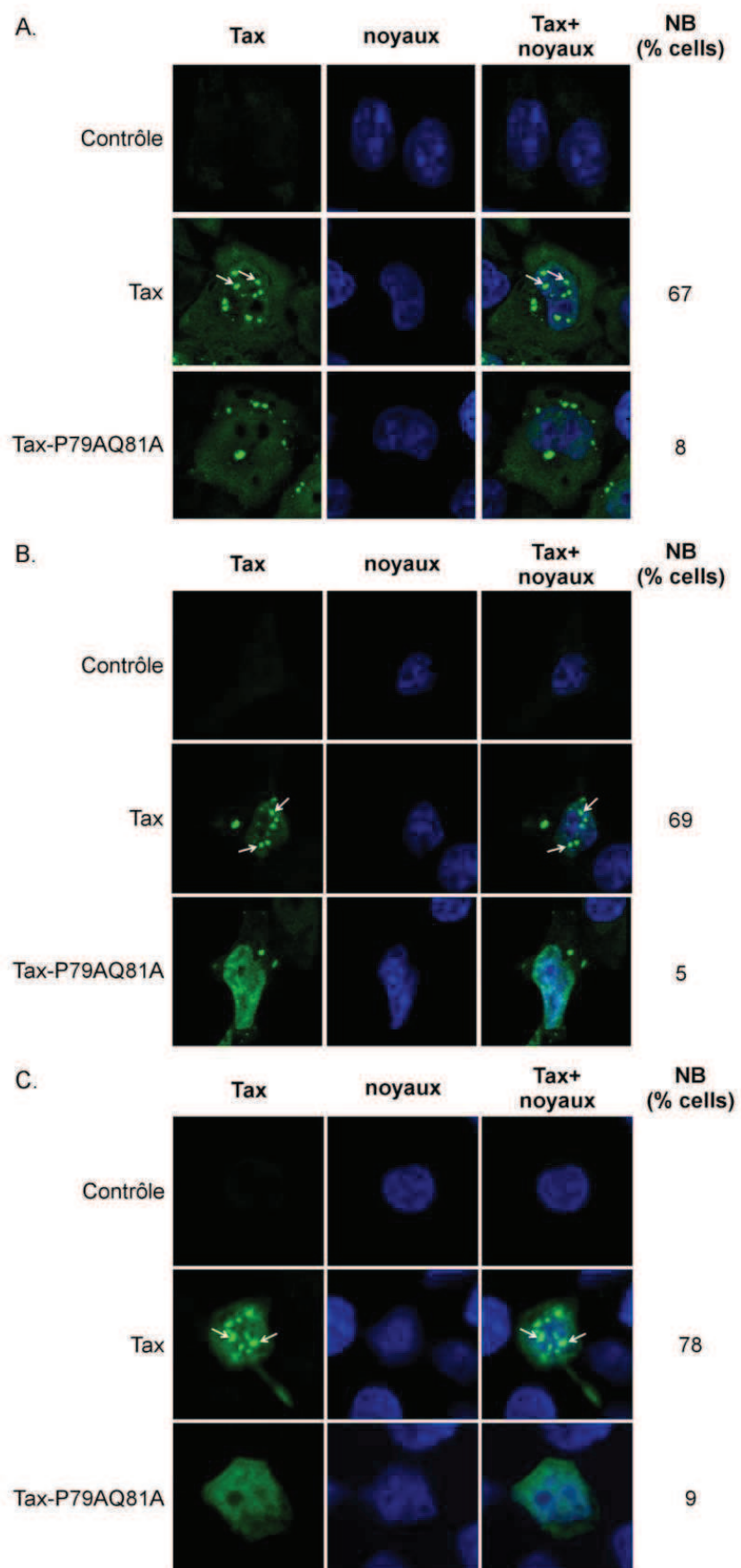


FIGURE 69 : LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TAX ET TAX-P79AQ81A

3. TAX-P79AQ81A ACTIVE LA VOIE NF- κ B AUSSI BIEN QUE TAX

Selon le modèle actuel (**Figure 54**), Tax active la voie NF- κ B à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le cytoplasme, Tax active le complexe IKK induisant ainsi la translocation nucléaire de RelA. Dans le noyau, Tax favorise l'interaction des dimères NF- κ B avec l'ADN favorisant ainsi la transcription à partir des promoteurs à élément de réponse κ B.

a) Tax-P79AQ81A active correctement la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B

Nous avons donc commencé par nous intéresser à la capacité du mutant Tax-P79AQ81A à activer le complexe IKK. Or cette activation implique une interaction entre la protéine Tax et le complexe IKK par l'intermédiaire de la sous-unité régulatrice du complexe, NEMO/IKK γ . Pour tester cette interaction de Tax-P79AQ81A avec NEMO, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées en cellules HeLa. Ces cellules ont été transfectées avec des plasmides vide ou codant la protéine Tax, Tax-P79AQ81A ou Tax-M22. Ce dernier mutant de Tax est reconnu comme n'activant pas la voie NF- κ B et il a notamment été décrit comme n'étant pas capable d'interagir avec NEMO (Harhaj and Sun, 1999). Après immunoprécipitation de Tax avec un anticorps monoclonal anti-Tax, les fractions immunoprécipitées mais également les lysats cellulaires totaux sont analysées par immunoblot. Le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 permet de révéler l'expression des différentes protéines Tax dans les cellules (**Figure 70**, lysats panneau Tax). Ces protéines sont bien immunoprécipitées spécifiquement et de façon équivalente par l'anticorps anti-Tax (**Figure 70**, IP Tax panneau Tax). Comme attendu, NEMO endogène est co-immunoprécipité avec Tax sauvage mais pas avec Tax-M22, validant ainsi l'expérience (**Figure 70**, IP Tax, panneau NEMO pistes 2 versus 4). Pourtant, NEMO est bien exprimé de façon équivalente dans tous les lysats cellulaires (**Figure 70**, Lysats, panneau NEMO). NEMO est tout aussi bien co-immunoprécipité avec Tax-P79AQ81A qu'avec Tax (**Figure 70**, IP Tax, panneau NEMO piste 3 et 2). Tax-P79AQ81A interagit donc correctement avec la sous-unité NEMO du complexe IKK. De façon intéressante, l'expression de Tax ou Tax-P79AQ81A dans les cellules entraîne la modification d'une partie de NEMO qui apparaît à un poids moléculaire apparent légèrement plus élevé que NEMO. Cette bande n'apparaît pas lorsque Tax n'est pas exprimé dans les cellules ou en présence de Tax-M22 (**Figure 70**, Lysats, panneau NEMO). Cette modification de NEMO correspond très probablement à la

phosphorylation de NEMO préalablement décrite comme constitutive dans les cellules exprimant Tax (Carter et al., 2001). Or cette phosphorylation fait normalement suite à la phosphorylation de la sous-unité catalytique du complexe IKK, IKK β , et donc à son activation. Il semble donc que Tax et Tax-P79AQ81A soient capables d'activer le complexe IKK contrairement à Tax-M22. Pour confirmer cela, nous avons cherché à détecter la présence des formes phosphorylées et donc activées des sous-unités catalytiques du complexe IKK, aussi bien IKK α que IKK β , exprimées de façon endogène dans les lysats cellulaires. Ces formes sont effectivement présentes de façon équivalente dans les cellules exprimant Tax ou Tax-P79AQ81A alors qu'elles sont absentes des cellules n'exprimant pas Tax ou exprimant le mutant Tax-M22 déficient dans l'activation de la voie NF- κ B (**Figure 70**, Lysats, panneau Phospho-IKK).

Ainsi, le mutant Tax-P79AQ81A est tout aussi capable que Tax d'interagir avec NEMO et d'activer le complexe IKK.

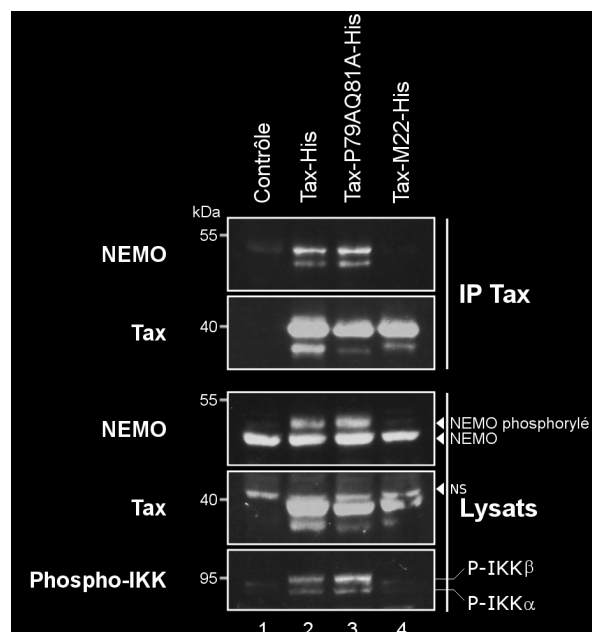


FIGURE 70 : TAX ET TAX-P79AQ81A INTERAGISSENT AVEC LE COMPLEXE IKK

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant les protéines Tax sauvage, P79AQ81A ou M22 avec une étiquette Histidine. Les cellules ont été lysées 24h après la transfection et une partie des lysats a été incubée toute la nuit avec des anticorps anti-Tax. L'incubation avec des billes de sépharose recouvertes de protéines G pendant 1h a ensuite permis de récupérer les complexes immuns. Après élution, les fractions immunoprécipitées ou les lysats totaux sont analysées par immunoblot avec un anticorps anti-NEMO ou le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1. Les lysats totaux sont également immunomarqués avec un anticorps dirigé spécifiquement contre les formes phosphorylées de IKK α et β .

L'interaction de Tax avec le complexe IKK entraîne normalement sa relocalisation dans les agrégats périnucléaires pour induire ensuite la libération des dimères NF- κ B. Nous avons

donc vérifié si l'interaction observée entre Tax-P79AQ81A et le complexe IKK était bien fonctionnelle et permettait effectivement le recrutement du complexe dans les agrégats périnucléaires. Pour cela, nous avons d'abord réalisé une séparation des fractions solubles et insolubles des lysats cellulaires comme cela avait été décrit précédemment (Garcia-Mata et al., 1999). L'accumulation de protéines polyubiquitinylées et insolubles dans des structures périnucléaires, les agrésomes, a été précédemment décrite (Ward et al., 1995) et il est probable que les agrégats périnucléaires de Tax soient aussi dans la fraction insoluble. Les protéines Tax et Tax-P79AQ81A sont présentes dans les deux fractions, soluble et insoluble (**Figure 71A**). La protéine NEMO est majoritairement présente dans la fraction soluble et très peu dans la fraction insoluble en absence de la protéine Tax. Par contre, lorsque Tax ou Tax-P79AQ81A est exprimée dans les cellules, la proportion de NEMO dans la fraction insoluble augmente (**Figure 71A**, pistes 5 et 6 comparé à piste 4). La protéine Tax mutée semble donc avoir la même capacité que Tax sauvage à induire une relocalisation de NEMO dans les agrégats périnucléaire.

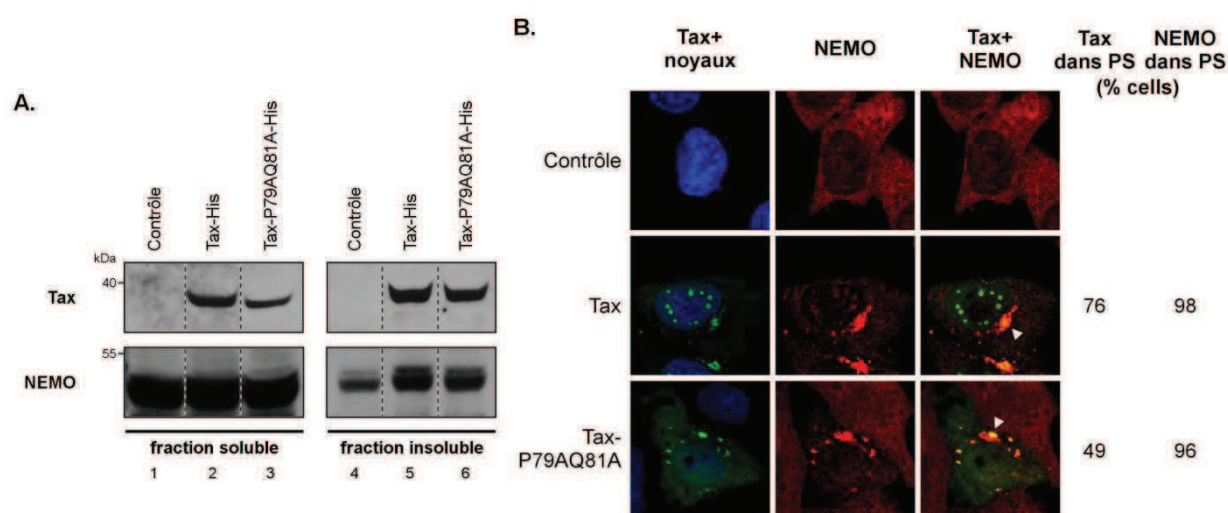


FIGURE 71 : TAX ET TAX-P79AQ81A RELOCALISENT NEMO

A. et B. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His.

A. Les cellules ont été lysées dans un tampon qui permet de séparer les fractions solubles et insolubles. Chaque fraction a ensuite été analysée par immunoblot avec le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 ou un anticorps anti-NEMO.

B. Les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec des anticorps anti-Tax (vert) et anti-NEMO (rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules présentant des agrégats périnucléaires (PS) de Tax et de NEMO ont été dénombrées. En rapportant ce nombre au nombre de cellules positives pour le marquage Tax on obtient le pourcentage de cellules dans lesquelles Tax ou NEMO forment des agrégats périnucléaires. Ces pourcentages sont indiqués à droite des images. Au moins 100 cellules ont été analysées dans chaque condition. Les têtes de flèches indiquent les agrégats périnucléaires où colocalisent Tax et NEMO.

Pour confirmer que cette relocalisation de NEMO observée sur le fractionnement correspond bien à un recrutement dans les agrégats périnucléaires, nous avons ensuite procédé à des immunofluorescences pour observer directement la localisation subcellulaire de NEMO en présence de Tax-P79AQ81A. Les cellules HeLa, après avoir été transfectées avec un plasmide vide ou codant les protéines Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His et fixées, ont été doublement immunomarquées avec un anticorps anti-Tax et un anticorps anti-NEMO. En absence de Tax, le marquage de NEMO est diffus dans les cellules, surtout dans le cytoplasme (**Figure 71B**, ligne 1). Lorsque Tax est exprimé dans les cellules, NEMO est recruté dans des agrégats périnucléaires dans presque toutes les cellules (98%) (**Figure 71B**, ligne 2). Ces agrégats de NEMO colocalisent avec les agrégats périnucléaires de Tax mais se forment parfois même si les agrégats Tax ne sont pas visibles car seuls 76% des cellules présentent également des agrégats périnucléaires Tax. La protéine Tax-P79AQ81A exprimée dans les cellules a la même efficacité de recrutement de NEMO dans des agrégats périnucléaires, qui colocalisent avec les agrégats périnucléaires formés par Tax-P79AQ81A quand ils sont présents (**Figure 71B**, ligne 3). Ainsi Tax-P79AQ81A est donc non seulement capable d'interagir avec NEMO mais également de le recruter dans les agrégats périnucléaires.

Le meilleur marqueur de l'activation de la phase cytoplasmique est la translocation de RelA dans le noyau suite à la phosphorylation de I κ B α par le complexe IKK. Nous avons donc analysé la translocation nucléaire de RelA dans le noyau des cellules exprimant Tax-P79AQ81A grâce à des expériences d'immunofluorescence. Les cellules HeLa transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His sont immunomarquées avec des anticorps anti-Tax et anti-RelA. Dans les cellules contrôles où la protéine Tax n'est pas exprimée, RelA est majoritairement présent de façon diffuse dans le cytoplasme (**Figure 72**, ligne 1). Par contre, toutes les cellules qui expriment la protéine Tax montrent une présence plus importante de RelA dans le noyau que dans le cytoplasme (**Figure 72**, ligne 2). De plus, lorsque Tax forme des corps nucléaires, RelA est recruté dans ces corps nucléaires. De la même façon, l'expression de Tax-P79AQ81A dans les cellules induit la translocation de RelA dans le noyau de toutes les cellules même si le marquage RelA reste diffus dans ces noyaux (**Figure 72**, ligne 3).

La protéine Tax mutée dans le motif PxQxT est donc aussi capable que Tax sauvage d'interagir avec NEMO et d'activer le complexe IKK, de le recruter dans les agrégats

périnucléaires pour induire finalement la translocation nucléaire de RelA. Tous ces résultats démontrent que Tax-P79AQ81A active efficacement la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B. Ces résultats sont cohérents avec nos observations précédentes d'une ubiquitinylation équivalente entre Tax et Tax-P79AQ81A puisque c'est cette modification qui est essentielle dans cette phase de l'activation (**Figure 54**).

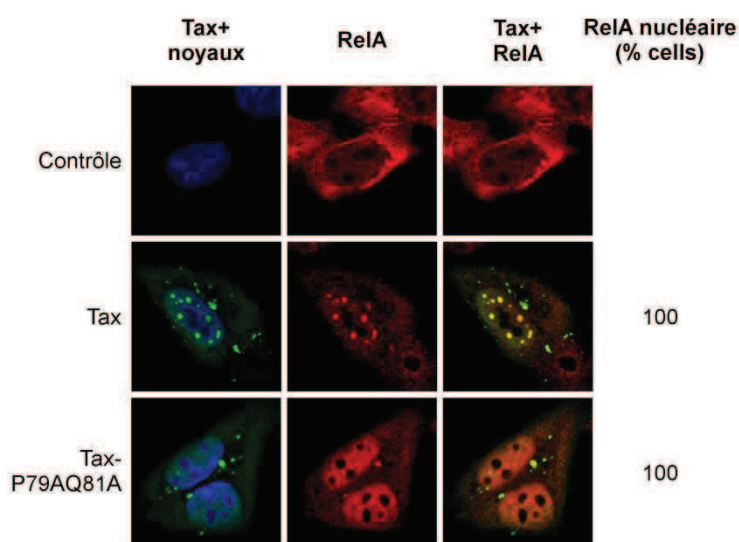


FIGURE 72 : TAX ET TAX-P79AQ81A ACTIVENT LA PHASE CYTOPLASMIQUE DE LA VOIE NF- κ B

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His. Les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec des anticorps anti-Tax (vert) et anti-RelA (rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules présentant RelA dans le noyau ont été dénombrées. En rapportant ce nombre au nombre de cellules positives pour le marquage Tax on obtient le pourcentage de cellules dans lesquelles RelA a subi une translocation nucléaire. Ce pourcentage est indiqué à droite des images. Au moins 100 cellules ont été analysées dans chaque condition.

b) Tax-P79AQ81A active la transcription dépendante de NF- κ B

D'après le modèle actuel, une fois le dimère NF- κ B dans le noyau, Tax favorise son interaction avec l'ADN et permet ainsi une activation optimale de la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B (**Figure 54**). Le mutant Tax-P79AQ81A est capable d'induire la translocation du dimère NF- κ B dans le noyau aussi efficacement que la protéine Tax sauvage. Il nous restait donc à déterminer l'effet de Tax-P79AQ81A au niveau nucléaire. Pour cela, nous avons eu recours à des tests de transactivation de gènes rapporteurs. En effet, des différences de transactivation entre Tax et Tax-P79AQ81A auraient impliqué des différences d'action des deux protéines dans le noyau puisque l'activation de la phase cytoplasmique en amont est équivalente.

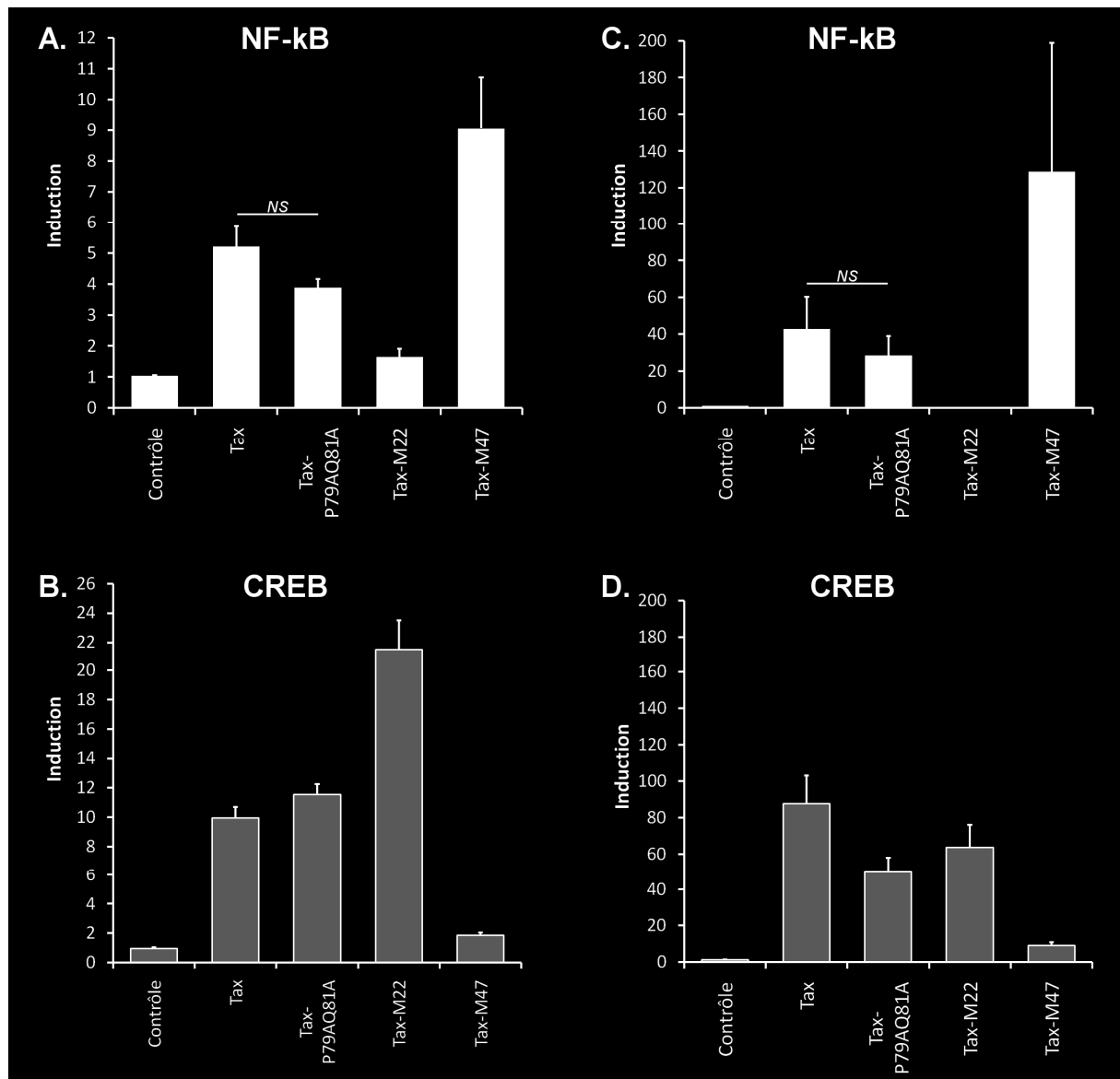


FIGURE 73 : TAX ET TAX-P79AQ81A TRANSACTIVENT LES PROMOTEURS A ELEMENTS DE REPONSE κB DANS LES CELLULES ADHERENTES

A. à D. Des cellules HeLa (**A. et B.**) ou 293T (**C. et D.**) ont été co-transfectées avec une construction p κB -Luc (**A. et C.**) ou pLTR-Luc (**B. et D.**) et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou les mutants Tax-P79AQ81A-His, Tax-M22-His et Tax-M47-His. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences indépendantes sont représentées. *NS* : statistiquement non significatif.

Nous avons effectué ces tests dans différents types cellulaires : dans les cellules adhérentes où nous avons déjà mis en évidence le défaut de SUMOylation et de formation des corps nucléaires de Tax-P79AQ81A, une lignée de lymphocytes T où nous avons également mis en évidence le défaut de formation des corps nucléaires de Tax-P79AQ81A et enfin des lymphocytes T primaires pour se rapprocher au maximum d'un modèle

physiologique. Dans chaque cas, les cellules sont transfectées avec un vecteur vide ou un plasmide codant une protéine Tax sauvage ou mutée. Les cellules sont co-transfectées avec deux constructions codant pour des gènes rapporteurs luciférase différents : p κ B-Luc (dépendant de NF- κ B) ou pLTR-Luc (dépendant de CREB) et pRL-TK (constitutivement exprimée). Les mutants Tax-M22 et Tax-M47 sont ajoutés à chaque expérience car en n'activant que les promoteurs à éléments de réponse CRE ou κ B, respectivement, ils sont de bons contrôles pour valider l'expérience (Smith and Greene, 1990).

Dans les cellules HeLa, la protéine Tax active la transcription à partir du promoteur à éléments de réponse κ B d'un facteur 5 environ par rapport au contrôle (**Figure 73A**). Comme attendu, le mutant Tax-M22 ne transactive par ce promoteur au contraire de Tax-M47 qui est plus efficace que Tax sauvage comme précédemment décrit (Smith and Greene, 1990). Le mutant Tax-P79AQ81A induit également la transcription à partir du promoteur à éléments de réponse κ B presque aussi efficacement que Tax. La légère différence de moyenne des différentes expériences réalisées est en effet non significative d'après le test statistique t. Tax-P79AQ81A est également capable d'activer la transcription dépendante de CREB aussi bien que Tax, confirmant que ce mutant ne présente pas d'anomalie de structure ou d'expression (**Figure 73B**). Pour finir de valider l'expérience, nous avons pu vérifier que le mutant Tax-M22, mais pas Tax-M47, transactivait le promoteur à éléments de réponse CRE.

Les résultats obtenus en cellules 293T sont rigoureusement équivalents. De la même façon qu'en cellules HeLa, la légère différence d'induction de la transcription dépendante de NF- κ B entre Tax et Tax-P79AQ81A est statistiquement non significative (**Figure 73C**). Là-encore, les mutants M22 et M47 permettent de valider ces expériences dans ce modèle cellulaire, M22 et M47 n'activant effectivement que les promoteurs à éléments de réponse CRE ou κ B, respectivement (**Figure 73C et D**).

Les mêmes expériences dans une lignée de lymphocyte T CEM nous a permis d'aboutir aux mêmes résultats. Dans ces cellules, l'induction de la transcription dépendante de NF- κ B par Tax est également très nette et le mutant Tax-P79AQ81A active cette transcription aussi efficacement que Tax (**Figure 74A**). De plus, les mutants M22 et M47 permettent également de valider les résultats dans ce type cellulaire (**Figure 74A et B**).

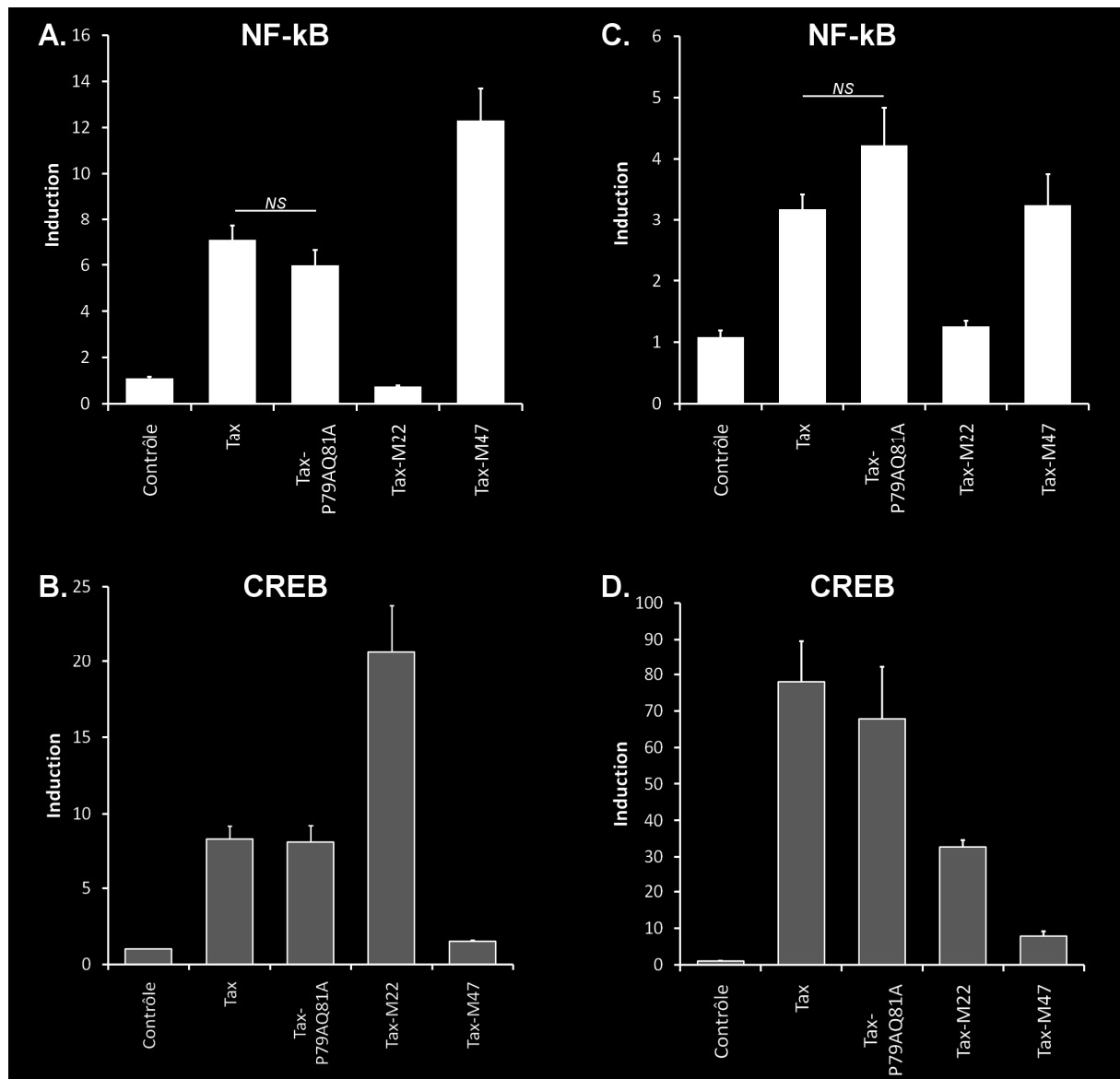


FIGURE 74 : TAX ET TAX-P79AQ81A TRANSACTIVENT LES PROMOTEURS A ELEMENTS DE REPONSE κ B DANS DES CELLULES T

A. à D. Des cellules T CEM (**A. et B.**) ou lymphocytes T CD4⁺ primaires (**C. et D.**) ont été co-transfectés avec une construction pκB-Luc (**A. et C.**) ou pLTR-Luc (**B. et D.**) et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou les mutants Tax-P79AQ81A-His, Tax-M22-His et Tax-M47-His. 48h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences indépendantes sont représentées. *NS* : statistiquement non significatif.

Il était essentiel de réaliser ces expériences également dans des lymphocytes T CD4⁺ primaires pour se rapprocher au maximum des cellules naturellement infectées par le virus HTLV-1. Dans ces cellules, il est évident que Tax-P79AQ81A active aussi efficacement la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B que Tax. La moyenne d'induction est en effet légèrement supérieure pour Tax-P79AQ81A que pour Tax même si

cette différence n'est pas statistiquement significative (**Figure 74C**). La transactivation des promoteurs répondant à CREB est équivalente entre les protéines Tax sauvage et mutée, confirmant que la protéine Tax-P79AQ81A n'est pas surexprimée dans ces cellules par rapport à Tax (**Figure 74D**).

Dans tous ces types cellulaires différents, la protéine Tax mutée dans le motif PxQxT est donc capable de transactiver les promoteurs répondant à NF- κ B aussi efficacement que Tax sauvage et notamment dans les lymphocytes T primaires.

L'ensemble de ces résultats montre donc que, malgré son défaut très sévère de formation des corps nucléaires et de SUMOylation, la protéine mutée Tax-P79AQ81A est non seulement capable d'activer la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B mais surtout d'activer la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B aussi efficacement que Tax. Ces résultats suggèrent donc fortement que la formation des corps nucléaires et la SUMOylation de Tax ne seraient pas nécessaires à l'activation optimale de la voie NF- κ B. Pour confirmer ces résultats qui vont à l'encontre du modèle actuel, nous avons réalisés des expériences complémentaires.

C. LES CORPS NUCLEAIRES TAX NE SONT PAS REQUIS POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B DANS LES LIGNEES CHRONIQUEMENT INFECTEES

Pour se rendre compte de la nécessité des corps nucléaires dans l'activation de la voie NF- κ B, nous avons voulu les étudier dans un contexte de cellules T chroniquement infectées par le virus HTLV-1, des cellules C8166 et HUT102. Dans les cellules C8166, la majorité du provirus HTLV-1 a été délétée mais l'expression de la protéine Tax demeure (Bhat et al., 1993). Dans les cellules HUT102, première lignée HTLV-1 décrite par Robert Gallo et son équipe, toutes les protéines virales sont par contre exprimées (Poiesz et al., 1980). Ces cellules sont connues pour présenter une activation constitutive de la voie NF- κ B (Geleziunas et al., 1998; Uhlik et al., 1998).

Nous avons donc effectué des immunofluorescences sur ces cellules. Nous les avons déposées sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine avant de les fixer et de les marquer avec des anticorps anti-Tax et anti-NEMO. Comme toutes ces cellules sont positives

pour Tax, avec l'anticorps anti-Tax, nous les avons mélangées avec des cellules T CEM avec un ratio d'environ 1 :1. Les CEM, qui n'expriment pas Tax et sont reconnaissables à leur petite taille comparée aux cellules C8166 et HUT-102, nous ont permis de différencier le marquage spécifique Tax du bruit de fond. Que ce soit avec les C8166 ou les HUT-102, l'observation au microscope confocal a révélé qu'à peine plus de 5% des cellules présentent des corps nucléaires (**Figure 75**). Dans ces cellules en effet, Tax est essentiellement présente de façon diffuse aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Par contre, alors que NEMO est présent de façon homogène dans le cytoplasme des cellules Tax négatives (CEM), sa localisation est très altérée dans les cellules exprimant Tax. En effet, dans les cellules chroniquement infectées, NEMO est relocalisé dans des agrégats cytoplasmiques bien visibles et caractéristiques de la relocalisation déjà observée dans les cellules HeLa transfectées avec un plasmide codant Tax (**Figure 71B**), suggérant fortement une activation de la voie NF- κ B dans ces cellules.

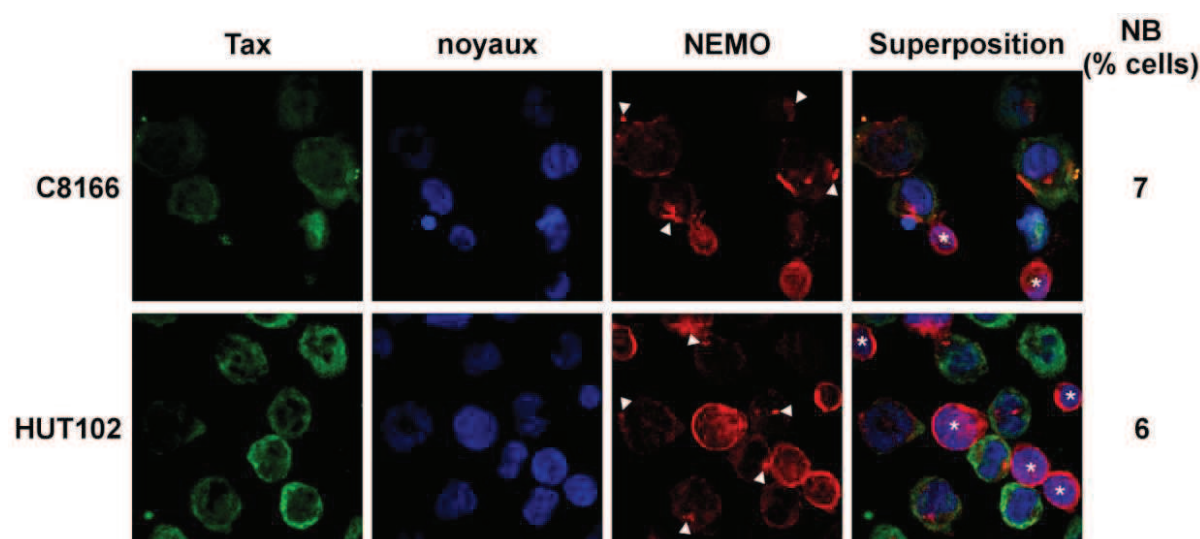


FIGURE 75 : LES CORPS NUCLEAIRES SONT QUASIMENT ABSENTS DES CELLULES CHRONIQUEMENT INFECTÉES PAR HTLV-1

Un mélange de cellules CEM et C8166 ou HUT102 a été déposé, selon un ratio d'environ 1:1, sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax (vert) et un anticorps anti-NEMO (rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules présentant des corps nucléaires Tax ont été dénombrées. En rapportant ce nombre au nombre de cellules positives pour le marquage Tax on obtient le pourcentage de cellules dans lesquelles Tax forme des corps nucléaires. Ce pourcentage est indiqué à droite des images. Au moins 200 cellules ont été analysées dans chaque condition. Les têtes de flèches indiquent les agrégats périnucléaires de NEMO. Les étoiles marquent les CEM.

Ainsi, dans une situation très proche de la situation physiologique, la protéine Tax ne forme pas de corps nucléaires dans la très grande majorité des cellules infectées dans lesquelles la voie NF- κ B est pourtant activée. Ces résultats renforcent l'idée que les corps nucléaires ne sont pas nécessaires pour le fonctionnement de Tax dans les cellules infectées et notamment pour l'activation de la transcription dépendante de NF- κ B.

D. L'UBIQUITINYLATION DE TAX EST ESSENTIELLE POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B MAIS PAS SA SUMOYLATION

Comme pour les corps nucléaires, nous avons voulu confirmer nos résultats obtenus avec le mutant Tax-P79AQ81A suggérant que la SUMOylation de Tax n'est pas nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Nous avons donc essayé de corréler les taux d'ubiquitinylation et de SUMOylation de plusieurs mutants de Tax avec leur capacité à transactiver les promoteurs à éléments de réponse κ B. Pour cela, nous avons utilisé des protéines Tax, précédemment générées au laboratoire, dans lesquelles certaines lysines ont été mutées (Nasr et al., 2006) (**Figure 76**).

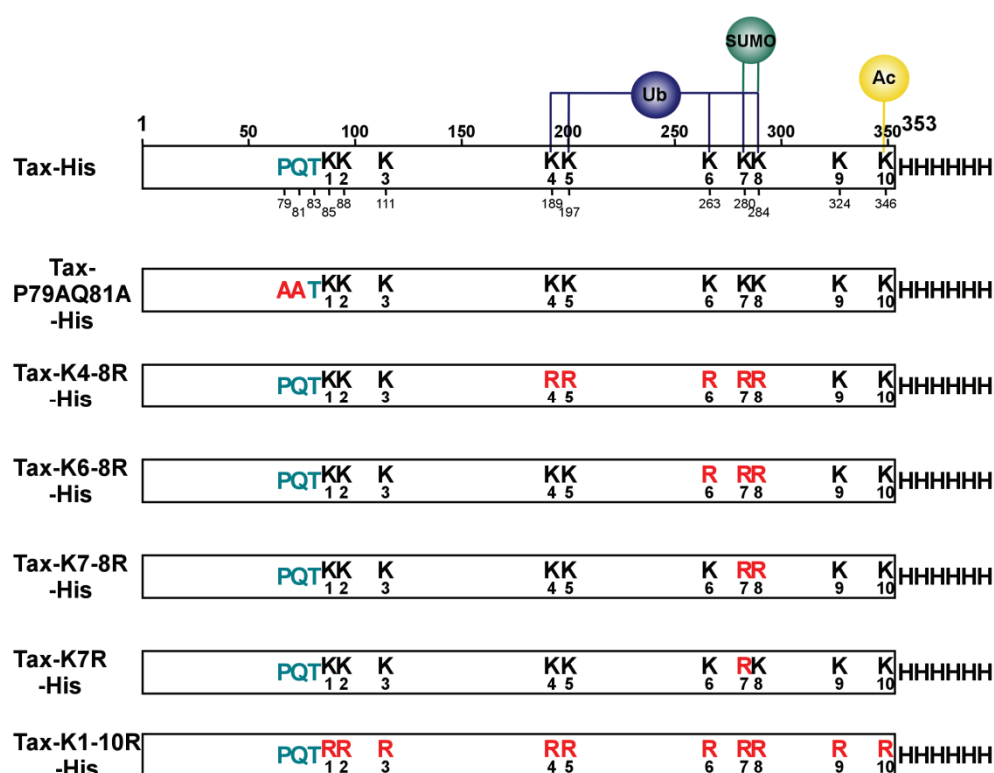


FIGURE 76 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE TAX-HIS ET DE SES MUTANTS

Le motif PxQxT (en bleu) et les différentes lysines sont indiqués avec leur position dans la séquence de Tax. Les modifications post-traductionnelles qui touchent les résidus lysine sont également indiquées. Les différents mutants utilisés dans nos expériences sont présentés avec les résidus mutés qui apparaissent en rouge.

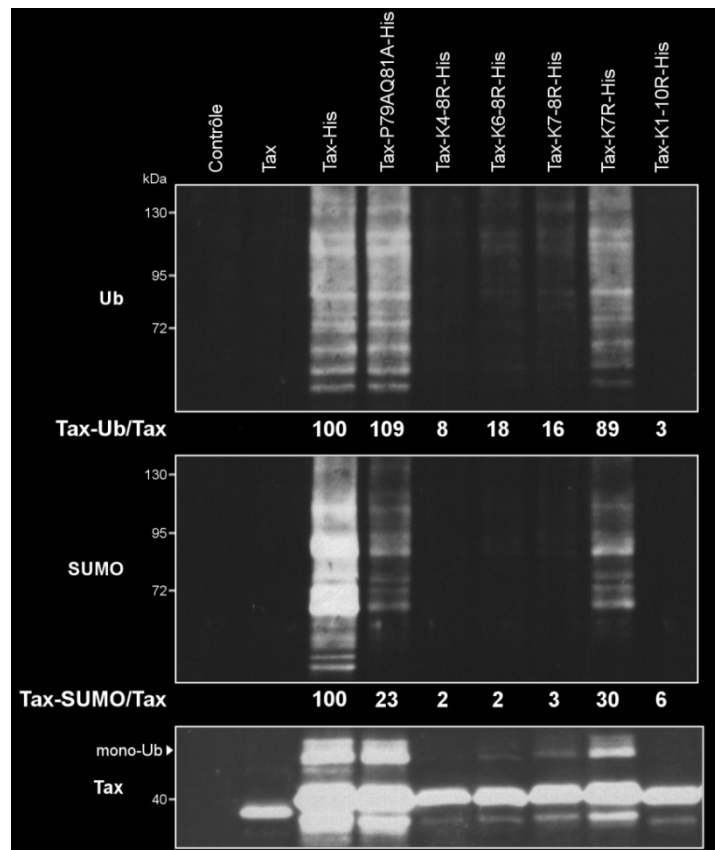


FIGURE 77 : UBIQUITINYLATION ET SUMOYLATION DES MUTANTS DE TAX

Des cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou différents mutants comme indiqué. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-ubiquitine, anti-SUMO2/3 et un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation ou de la SUMOylation de Tax détectée sur le panneau ubiquitine ou SUMO est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax et Tax-SUMO/Tax). L'ubiquitinylation de Tax sauvage est fixée à 100%.

Nous avons commencé par déterminer le profil d'ubiquitinylation et de SUMOylation des mutants de lysines suivants : K1-10R, où toutes les lysines de Tax ont été mutées, K4-8R, K6-8R et K7-8R, dans lesquels les lysines cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation ont été mutées et K7R, où seule la lysine 7 a été mutée (**Figure 76**). Comme décrit précédemment, nous avons purifié ces différentes protéines, ainsi que Tax-His et Tax-P79AQ81A-His, sur résine de nickel à partir de cellules 293T transfectées. Puis nous les avons analysées par immunoblot avec des anticorps anti-ubiquitine et anti-SUMO (**Figure 77**). Le mélange de sérums de patients infectés nous a également permis de vérifier que ces différents mutants étaient exprimés et purifiés dans des proportions proches et en tout cas de normaliser les signaux ubiquitine et SUMO sur la quantité de Tax non conjugué purifié. La révélation de Tax nous a également permis de vérifier que la protéine Tax sans étiquette 6-Histidines n'était pas observée confirmant la spécificité de la purification sur les billes de

nickel. L'ubiquitinylation et la SUMOylation de Tax sauvage étant fixée à 100%, ces expériences ont encore une fois confirmé que Tax-P79AQ81A était un peu plus ubiquitinylé que Tax alors que sa conjugaison à SUMO était très réduite. Comme attendu, la protéine Tax où toutes les lysines sont mutées, Tax-K1-10R-His, n'est pas du tout ubiquitinylée ni SUMOylée. De la même façon, le mutant de lysines Tax-K4-8R-His, où toutes les lysines cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation sont mutées, n'est ni ubiquitinylé ni SUMOylé. Les mutants Tax-K6-8R-His et Tax-7-8R-His sont toujours très affectés dans leur ubiquitinylation et pas SUMOylés. De façon intéressante, le mutant Tax-K7R-His présente un phénotype très proche de Tax-P79AQ81A-His avec une ubiquitinylation seulement très légèrement inférieure à celle de Tax et par contre une SUMOylation très réduite, au même niveau que celle de Tax-P79AQ81A-His (**Figure 78**).

Nous avons ensuite étudié la capacité de ces différents mutants à activer la voie NF- κ B, en commençant par la phase cytoplasmique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation pour détecter l'association de Tax avec le complexe IKK endogène. Après transfection de cellules 293T avec des constructions codant Tax et ses différents mutants, ces protéines sont immunoprécipitées efficacement à partir des lysats cellulaires (**Figure 78**, IP Tax, panneau Tax), même si de légères différences d'expression existent entre les mutants (**Figure 78A**, Lysats, panneau Tax). La protéine NEMO endogène, exprimée dans toutes les cellules dans les mêmes proportions quelle que soit la protéine Tax transfectée (**Figure 78A**, Lysats, panneau NEMO), est co-immunoprécipitée avec Tax et Tax-P79AQ81A, comme précédemment montré, mais pas en absence de Tax ou avec Tax-M22, ce qui valide l'expérience (**Figure 78A**, IP Tax, panneau NEMO). Le mutant Tax-K7R co-immunoprécipite également efficacement NEMO alors qu'une très faible quantité de NEMO est observée après immunoprécipitation de Tax-K6-8R et K7-8R. Par contre, NEMO n'est pas du tout co-immunoprécipité avec les mutants Tax-K1-10R et Tax-K4-8R, deux mutants qui ne sont pas du tout ubiquitinylés. L'interaction de Tax avec NEMO induit l'activation des deux sous-unités catalytiques du complexe, IKK α et β , marquée par leur phosphorylation. Cette phosphorylation de IKK α et β est en effet visible dans les lysats des cellules qui expriment des protéines Tax capables d'interagir avec NEMO : Tax, Tax-P79AQ81A et Tax-K7R, et dans une bien moindre mesure Tax-K7-8R et Tax-K6-8R (**Figure 78A**, Lysats, panneau Phospho-IKK). IKK α et β phosphorylés sont également clairement détectés dans les fractions immunoprécipitées des protéines Tax qui sont capables d'interagir avec NEMO (**Figure 78A**,

IP Tax, panneau Phospho-IKK). En effet, Tax, en interagissant avec NEMO, recrute également les sous-unités catalytiques IKK α et β et induit ainsi leur phosphorylation. Ce recrutement du complexe IKK et la phosphorylation des sous-unités catalytiques est un révélateur de l'activation cytoplasmique de la voie NF- κ B. Nous avons donc quantifié la présence de IKK α et β phosphorylés dans les fractions immunoprécipitées pour chacune des protéines Tax sauvage ou mutants et nous avons normalisé cette quantité sur la quantité de Tax immunoprécipité dans chacune des fractions. Après avoir fixé la précipitation de IKK α et β phosphorylés par Tax sauvage à 100%, cette quantification a confirmé que Tax-P79AQ81A et Tax-K7R étaient de réels activateurs de la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B (84% et 95% respectivement). Alors que Tax-K7-8R et dans une moindre mesure Tax-K6-8R conservent une faible capacité à activer le complexe IKK, les mutants Tax-M22, Tax-K1-10R et Tax-K4-8R en sont incapables.

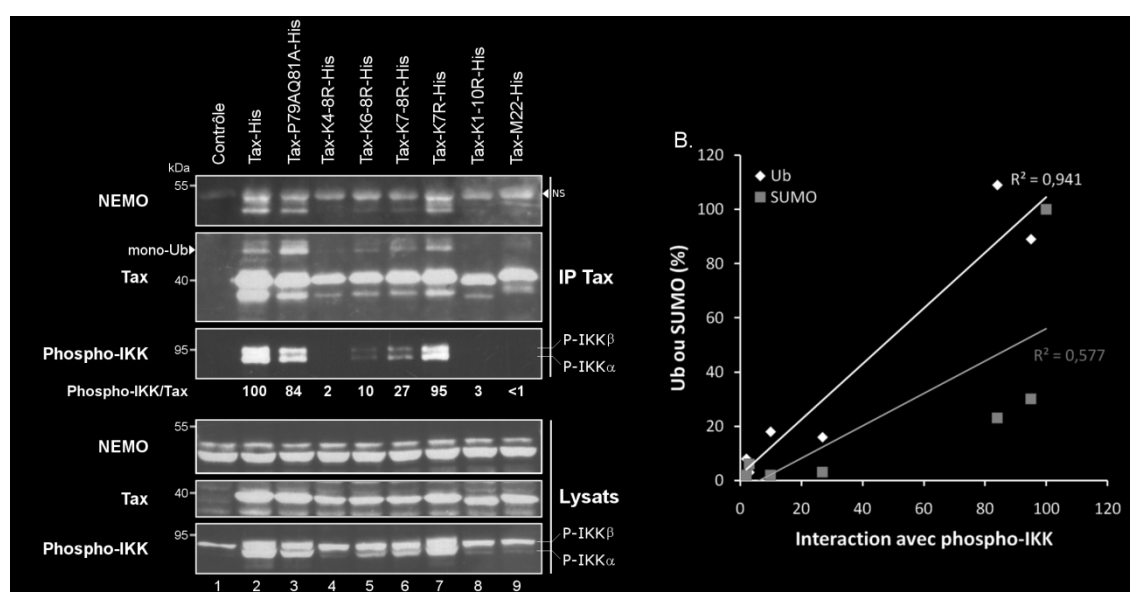


FIGURE 78 : CORRELATION ENTRE UBIQUITINYLATION DE TAX ET ACTIVATION DU COMPLEXE IKK

A. Des cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant les protéines Tax sauvage ou différents mutants avec une étiquette Histidine. Les cellules ont été lysées 24h après la transfection et une partie des lysats a été incubée toute la nuit avec des anticorps anti-Tax. L'incubation avec des billes de sépharose recouvertes de protéines G pendant 1h a ensuite permis de récupérer les complexes immuns. Après élution, les fractions immunoprécipitées ou les lysats totaux sont analysées par immunoblot avec un anticorps anti-NEMO, le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 et un anticorps dirigé spécifiquement contre les formes phosphorylées de IKK α et β . Les formes IKK α et β phosphorylés dans les fractions immunoprécipitées ont été quantifiées et normalisées par rapport à la quantité de Tax immunoprécipité dans chaque fraction (Phospho-IKK/Tax).

B. Chaque protéine Tax, Tax-P79AQ81A, Tax-K7R, Tax-K7-8R, Tax-K6-8R, Tax-K4-8R et Tax-K1-10R a été positionnée sur un graphique en fonction de son pourcentage d'ubiquitinylation (losange noir) ou de SUMOylation (carré gris), déterminé sur la Figure 77, en ordonnée, et de son pourcentage d'activation du complexe IKK (Phospho-IKK-Tax) en abscisse. Une régression linéaire a permis d'obtenir le coefficient de détermination (R^2) entre ubiquitinylation et activation du complexe IKK et SUMOylation et activation du complexe IKK.

Pour établir le lien entre ubiquitinylation et SUMOylation de Tax avec la capacité de Tax à activer la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B, nous avons représenté le pourcentage d'ubiquitinylation ou de SUMOylation de Tax et de ses différents mutants (**Figure 77**) en fonction de sa capacité à activer la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B, mesurée comme décrit ci-dessus par la co-précipitation de IKK α et β phosphorylés (**Figure 78B**). Par régression linéaire, nous avons obtenu le coefficient de détermination R^2 et ainsi confirmé qu'il existait une corrélation linéaire entre l'ubiquitinylation de Tax et sa capacité à activer la phase cytoplasmique de la voie NF- κ B ($R^2=0,94$) alors que ce n'est pas le cas pour la SUMOylation de Tax ($R^2=0,58$). Cette représentation graphique et mathématique démontre ainsi de façon formelle la nécessité de l'ubiquitinylation de Tax et l'activation du complexe IKK, comme cela avait déjà été observé par notre laboratoire et d'autres (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006; Shembade et al., 2007).

Nous avons ensuite déterminé la capacité de ces mutants de Tax à activer l'ensemble de la voie NF- κ B en mesurant la transactivation d'un promoteur à éléments de réponse κ B. Pour cela, nous avons d'abord choisi des lymphocytes T CD4+, cellules plus proches des cellules naturellement infectées par le virus HTLV-1 que les cellules adhérentes. Des cellules T CEM ont donc été co-transfectées avec les constructions p κ B-Luc ou pLTR-Luc et pRL-TK ainsi qu'avec un plasmide codant Tax ou ses mutants. Comme décrit ci-dessus pour le mutant Tax-P79AQ81A, le mutant Tax-K7R qui présente une ubiquitinylation équivalente à Tax mais une très forte réduction de sa SUMOylation, active la transcription à partir d'un promoteur dépendant de NF- κ B aussi efficacement que Tax (**Figure 79A**). Les mutants Tax-K6-8R et K7-8R très faiblement ubiquitinylés n'activent que partiellement les promoteurs à éléments de réponse κ B alors que les mutants Tax-K4-8R et K1-10R, non ubiquitinylés, n'activent pas du tout ces promoteurs (**Figure 79A**). Cependant, la même expérience réalisée avec des promoteurs répondant à CREB révèle que Tax-K1-10R est également incapable de transactiver ces promoteurs (**Figure 79B**). Il est donc très probable que la mutation de toutes les lysines de Tax altère de façon trop importante la structure de la protéine, la rendant non fonctionnelle, comme cela a été suggéré précédemment (Nasr et al., 2006). Les autres mutants de Tax sont par contre capables de transactiver les promoteurs à éléments de réponse CRE de manière similaire à Tax, confirmant que la mutation de certaines lysines et donc l'altération des modifications post-traductionnelles de Tax affecte spécifiquement

l'activation de la voie NF- κ B (**Figure 79B**). Comme dans les expériences précédentes, les mutants Tax-M22 et Tax-M47 nous permettent de valider les résultats obtenus puisqu'ils activent effectivement uniquement le promoteur à éléments de réponse CRE et κ B respectivement (**Figure 79**). Ainsi, ces résultats, notamment avec le mutant Tax-K7R, semblent confirmer nos précédentes observations, à savoir qu'une altération sévère de la SUMOylation de Tax n'affecte pas sa capacité à activer la transcription des promoteurs dépendants de NF- κ B.

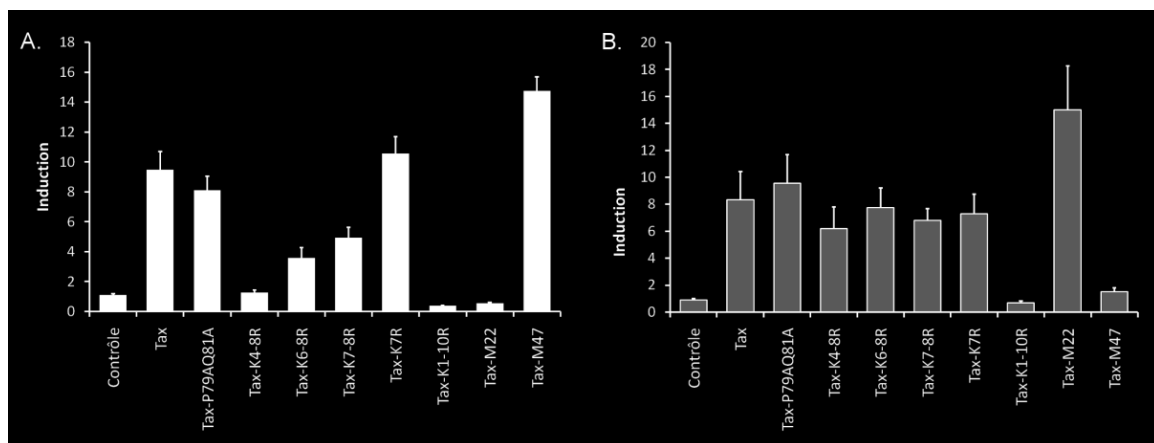


FIGURE 79 : ACTIVATION DE PROMOTEURS DEPENDANTS DE NF- κ B ET CREB PAR DIFFERENTS MUTANTS DE TAX DANS LES CEM

A. et B. Des cellules CEM ont été co-transfectées avec une construction pκB-Luc (**A.**) ou pLTR-Luc (**B.**) et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou les différents mutants de Tax comme indiqué. 48h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences indépendantes sont représentées.

Pour démontrer de manière plus rigoureuse que l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B dépend essentiellement de l'ubiquitinylation de Tax et pas de sa SUMOylation, il nous fallait établir des corrélations entre ubiquitinylation et transactivation dans le même type cellulaire. Nous avons donc déterminé la capacité de transactivation des différents mutants de Tax dans des cellules 293T en procédant comme décrit ci-dessus. Contrairement aux expériences dans les lymphocytes T, le mutant Tax-K7R transactive un peu moins efficacement les promoteurs à éléments de réponse κ B que Tax. Selon notre hypothèse, cela est cohérent avec son ubiquitinylation qui est un peu plus faible que celle de Tax. Tous les autres mutants de Tax sont incapables d'activer la transcription à partir d'un promoteur à éléments de réponse κ B, probablement le signe d'une dépendance encore plus

forte à l'ubiquitinylation de Tax dans les cellules 293T que dans les cellules T (**Figure 80A**). Sur les promoteurs dépendants de CREB, les mutants sont par contre fonctionnels, à part Tax-K1-10R (**Figure 80B**). Les mutants Tax-M22 et Tax-M47 valident toujours nos résultats à la fois sur les promoteurs à éléments de réponse κ B et CRE (**Figure 80A et B**).

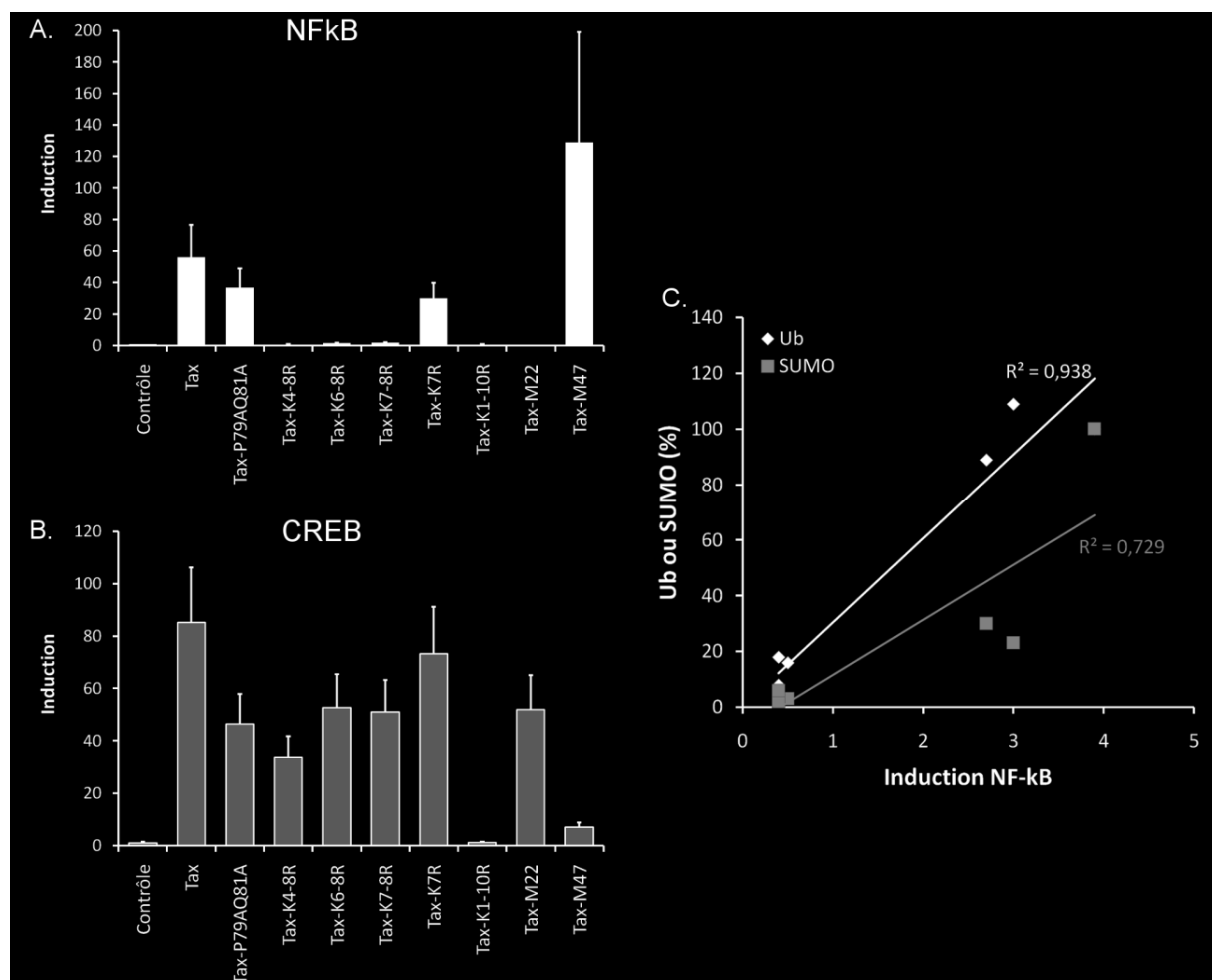


FIGURE 80 : CORRELATION ENTRE UBIQUITINYLATION DE TAX ET ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

A. et B. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec une construction p κ B-Luc (**A.**) ou pLTR-Luc (**B.**) et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax-His ou les différents mutants de Tax comme indiqué. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences indépendantes sont représentées.

C. Chaque protéine Tax, Tax-P79AQ81A, Tax-K7R, Tax-K7-8R, Tax-K6-8R, Tax-K4-8R et Tax-K1-10R a été positionnée sur un graphique en fonction de son pourcentage d'ubiquitinylation (losange noir) ou de SUMOylation (carré gris), déterminé sur la Figure 77, en ordonnée, et de son niveau d'induction de la transactivation d'un promoteur dépendant de NF- κ B en abscisse. Une régression linéaire a permis d'obtenir le coefficient de détermination (R^2) entre ubiquitinylation et transactivation et SUMOylation et transactivation.

Nous avons ensuite représenté les pourcentages d'ubiquitinylation ou de SUMOylation de Tax de la Figure 77 en fonction de la moyenne d'induction du promoteur à éléments de

réponse κB obtenue sur la Figure 80A. Une régression linéaire nous a permis comme ci-dessus d'établir une corrélation très forte entre l'ubiquitinylation de Tax et sa capacité à transactiver les promoteurs dépendants de NF- κB ($R^2=0,94$) alors que cette corrélation est beaucoup moins solide avec la SUMOylation de Tax ($R^2=0,73$) (Figure 80C).

Mutants	ubiquitinylation	SUMOylation	Formation de corps nucléaires	RelA nucléaire	Activation NF-κB
Tax	100	100	70	100	100
Tax-P79AQ81A	110	20	<10	100	85
Tax-K4-8R	<10	<10	<10	<10	10
Tax-K6-8R	20	<10	<10	80	40
Tax-K7-8R/ Tax-R4-6K	15	<10	<10	60	50
Tax-K7R	90	30			110
Tax-K1-10R	<10	<10	<10	<10	<10

TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES PROPRIETES DE TAX ET DE SES MUTANTS

Les différentes propriétés de Tax et de ses différents mutants analysées dans notre étude et dans celles de Lamsoul *et al.* et Nasr *et al.* sont récapitulées dans ce tableau (Lamsoul *et al.*, 2005; Nasr *et al.*, 2006). Tous les chiffres sont exprimés en pourcentages. L'ubiquitinylation et la SUMOylation ont été déterminés dans des cellules 293T par purification sur résine de nickel. La proportion de cellules avec des corps nucléaires ou RelA dans le noyau a été déterminée par immunofluorescence sur des cellules HeLa ou 293T en fonction des études. Enfin, l'activation de la voie NF- κB a été déterminée par des tests de transactivation dans des lignées de cellules T ou des 293T. Les propriétés de certains mutants n'ont pas encore été quantifiées.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats conforte nos observations avec le mutants Tax-P79AQ81A seul. La formation des corps nucléaires et la SUMOylation de Tax ne sont pas nécessaires à l'activation efficace de la voie NF- κB et de la transcription qui en découle (Tableau 4). Ces résultats vont donc à l'encontre du modèle actuel. Or l'importance de la SUMOylation de Tax et des corps nucléaires dans l'activation de la voie NF- κB a été établie précédemment suite à l'étude des mutants de lysines déficients pour la SUMOylation mais également partiellement pour l'ubiquitinylation, notamment les mutants Tax-K6-8R ou Tax-R4-6K (dont les lysines 7 et 8 sont mutées) qui présentaient un défaut d'activation de la voie NF- κB (Tableau 4). Or la fusion de SUMO1 à ces mutants permettait une restauration au moins partielle de la formation des corps nucléaires et de l'activité de transactivation des promoteurs dépendants de NF- κB (Lamsoul *et al.*, 2005; Nasr *et al.*, 2006) (Tableau 4). Nous avons donc décidé de fusionner SUMO1 à notre mutant Tax-P79AQ81A pour étudier l'effet de cette fusion sur le phénotype de notre mutant.

E. LA FUSION DE SUMO1 STABILISE TAX ET FAVORISE L'UBIQUITINYLATION DE TAX-P79AQ81A

Comme la fusion de SUMO1 avait précédemment permis de restaurer partiellement la formation des corps nucléaires par certains mutants de Tax, nous nous sommes donc d'abord intéressés à la localisation subcellulaire du mutant Tax-P79AQ81A fusionné à SUMO1. Nous avons donc réalisé des immunofluorescences sur cellules HeLa, transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax ou Tax-P79AQ81A, fusionnée ou non à SUMO1. Après fixation des cellules, elles ont été immunomarquées avec des anticorps anti-Tax et anti-RelA (**Figure 81**). Nous avons dénombrés les cellules en fonction de la localisation subcellulaire des protéines Tax : dans les corps nucléaires (NB), dans les agrégats périnucléaires (PS) et dans les deux (NB+PS). La fusion de SUMO1 à Tax favorise la formation de corps nucléaires puisque presque toutes les cellules exprimant Tax-SUMO1 présentent des corps nucléaires (98%) alors que Tax induit normalement la formation de corps nucléaires dans environ 70% des cellules. En parallèle, la fusion de SUMO1 à Tax réduit légèrement la formation d'agrégats périnucléaires dans les cellules (63%) comparé à Tax non fusionné (77%) (**Figure 81**, lignes 2 et 3). La fusion de SUMO1 à Tax-P79AQ81A augmente également de façon très significative la formation des corps nucléaires (69%) par rapport à Tax-P79AQ81A (8%) même si ces corps nucléaires apparaissent beaucoup plus petits que ceux formés par Tax (**Figure 81**, lignes 4 et 5). Par contre, alors que toutes les constructions Tax induisent la translocation nucléaire de RelA, elles ne permettent pas toutes son recrutement dans les corps nucléaires. En effet, nous avons quantifié, parmi les cellules qui présentaient des corps nucléaires, celles dans lesquelles RelA était également présent dans les corps nucléaires. Ainsi, alors que la très grande majorité des cellules exprimant Tax forment des corps nucléaires où se trouvent à la fois Tax et RelA (88%), les corps nucléaires formés par Tax-P79AQ81A-SUMO1 sont négatifs pour le marquage RelA dans environ 90% des cellules (**Figure 81**). Ainsi, la fusion de SUMO1 à Tax-P79AQ81A permet en effet de restaurer la formation de petits corps nucléaires mais qui ne sont probablement pas fonctionnels, en tout cas pour l'activation de la voie NF- κ B, puisque RelA n'est pas recruté dans ces corps.

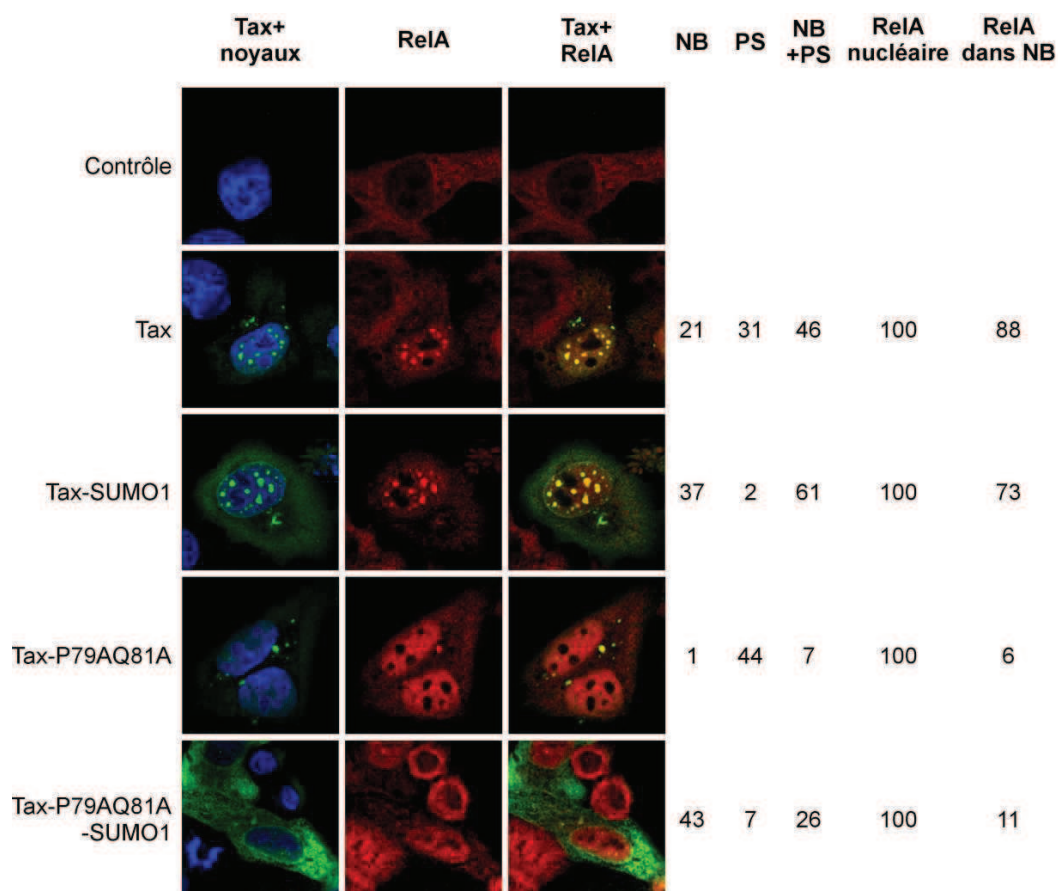


FIGURE 81 : LA FUSION DE SUMO1 A TAX FAVORISE LA FORMATION DE CORPS NUCLEAIRES MAIS SANS RECRUTEMENT DE RELA

Des cellules HeLa, cultivées sur lamelles de verre, ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His, fusionnée ou non à SUMO1. 24h après la transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec un anticorps monoclonal anti-Tax (vert) et anti-RelA (rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules ont été dénombrées en fonction de la localisation subcellulaire de Tax : dans les corps nucléaires (NB), dans les agrégats périnucléaires (AP) et dans les deux (NB+AP). Ces pourcentages sont indiqués à droite des images. La proportion de cellules positives pour Tax présentant RelA dans le noyau est également indiquée. Enfin, le pourcentage de cellules présentant des corps nucléaires Tax dans lesquelles RelA est également présent dans les corps nucléaires est indiqué (RelA dans NB). Au moins 100 cellules ont été analysées dans chaque condition.

De façon surprenante, nous avons observé que la fusion de SUMO1 à Tax ou Tax-P79AQ81A augmente le marquage Tax dans l'ensemble du cytoplasme. Pour étudier plus en détail cet effet, nous avons fractionné des cellules HeLa transfectées avec les différentes constructions en trois étapes pour séparer : une fraction cytosolique, une fraction intermédiaire notamment périnucléaire dont un marqueur spécifique est GM130, protéine de la membrane de l'appareil de Golgi, et une fraction nucléaire dont des marqueurs spécifiques sont les lamines A et C. Les différentes fractions ont ensuite été analysées par immunoblot avec différents anticorps. Les anticorps anti-GM130 et anti-Lamines A/C tout d'abord nous ont permis de valider notre fractionnement et l'identité de chacune de nos

fractions : la protéine GM130 est effectivement présente uniquement dans la fraction intermédiaire alors que les lamines A et C sont essentiellement présentes dans la fraction nucléaire (**Figure 82A**). Le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 révèle la présence de Tax ou Tax-P79AQ81A, fusionnées ou non à SUMO1, dans toutes les fractions (**Figure 82A**). Nous avons donc quantifié le signal de chacune des 3 bandes pour les 4 protéines et ajoutés les signaux des différentes fractions pour obtenir la quantité totale de Tax dans les cellules, celle de Tax sauvage étant fixée à 100%. Que ce soit avec Tax ou Tax-P79AQ81A, la fusion de SUMO1 augmente significativement la quantité totale de protéines dans les cellules (**Figure 82B**). La proportion de Tax dans chaque fraction est également déterminée en normalisant le signal de chacune des 3 fractions sur la quantité totale de protéines. La proportion de Tax dans la fraction intermédiaire est similaire entre la protéine Tax ou Tax-P79AQ81A et leurs équivalents fusionnés à SUMO1. La proportion de Tax-SUMO1 ou Tax-P79AQ81A-SUMO1 dans la fraction nucléaire est par contre un peu plus faible que leurs équivalents sans fusion. Mais l'effet le plus significatif de la fusion de SUMO1, aussi bien pour Tax que Tax-P79AQ81A, est l'augmentation de la quantité des protéines dans le cytosol (**Figure 82C**), ce qui est cohérent avec nos observations en microscopie confocale (**Figure 81**). La fusion de SUMO1 semble donc stabiliser la protéine Tax et permettre son accumulation dans le cytosol.

La localisation cytoplasmique de Tax étant associée à sa conjugaison à des chaînes d'ubiquitine K63, nous avons mesuré l'ubiquitinylation de Tax-SUMO1 et Tax-P79AQ81A-SUMO1 comparée à leurs équivalents non fusionnés. Les protéines ont été exprimées dans des cellules HeLa en présence d'ubiquitine où toutes les lysines sont mutées sauf la lysine K63. Seules des chaînes d'ubiquitine K63 peuvent donc être conjuguées à Tax. Après purification sur résine de nickel et analyse par immunoblot comme décrit ci-dessus, les protéines Tax-SUMO1 apparaissent ubiquitinylées de manière équivalente à Tax alors que les protéines Tax-P79AQ81A-SUMO1 sont beaucoup plus ubiquitinylées que Tax-P79AQ81A (**Figure 83A**). La fusion de SUMO1 favorise donc l'ubiquitinylation par des chaînes K63 de la protéine Tax mutée spécifiquement.

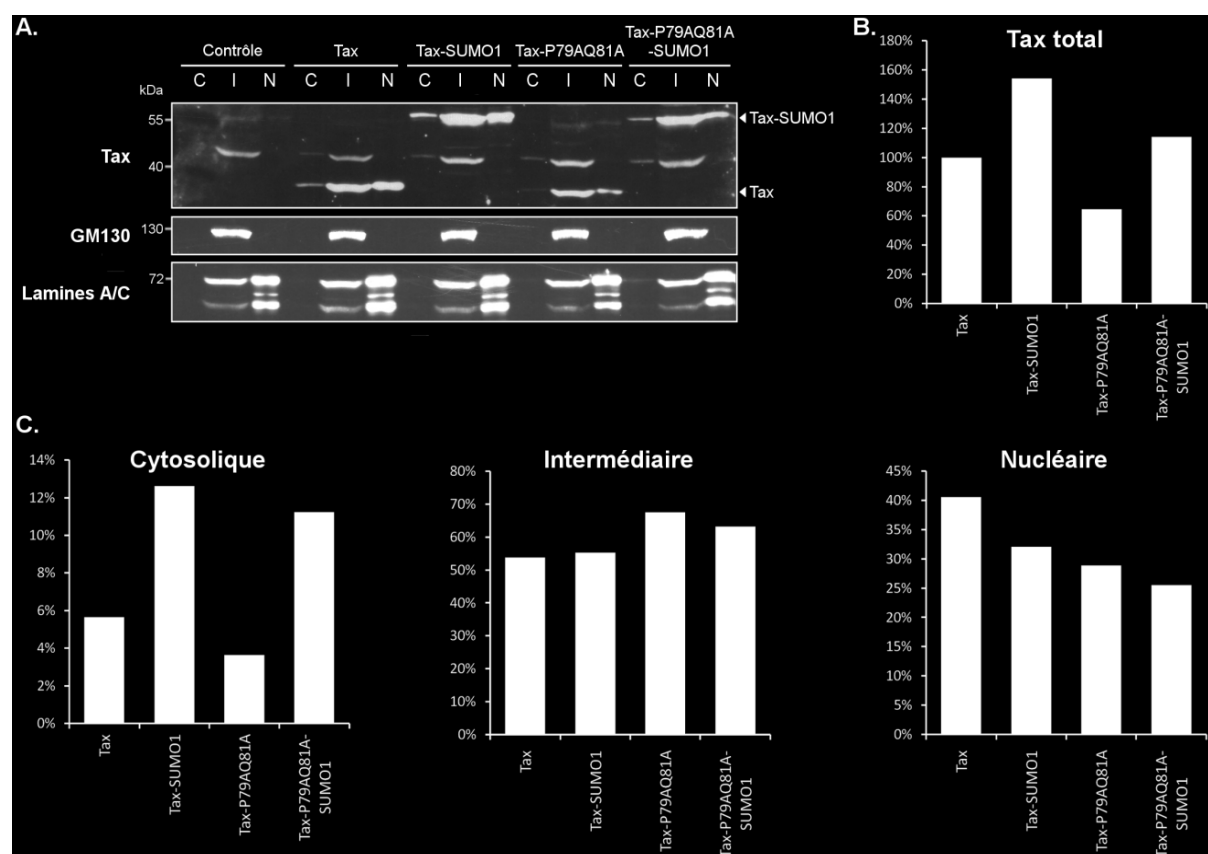


FIGURE 82 : LA FUSION DE SUMO1 STABILISE TAX DANS LE CYTOSOL

A. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant les protéines Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His ou leurs équivalents fusionnés à SUMO1. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées en 3 étapes pour séparer la fraction cytosolique (C), la fraction intermédiaire (I) et la fraction nucléaire (N). Les 3 fractions ont été analysées par immunoblot avec le mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 et des anticorps anti-GM130 et anti-Lamines A/C.

B. Pour chaque protéine Tax, le signal de la bande de chaque fraction a été quantifié et la quantité totale de protéines a été obtenue en ajoutant les 3 signaux. La quantité de Tax sauvage dans les cellules a été fixée à 100%.

C. Le signal de chaque bande a été rapporté à la quantité totale de protéines pour obtenir la proportion de chaque protéine dans chaque fraction.

Grâce à un test de transactivation de promoteur à éléments de réponse κ B, la capacité d'activation de la voie NF- κ B de Tax-SUMO1 et Tax-P79AQ81A-SUMO1 a été évaluée dans les cellules HeLa. Pour identifier l'effet de la fusion de SUMO1 sur chaque protéine Tax ou Tax-P79AQ81A, nous avons fixé l'induction par les protéines non fusionnées à 1 pour l'un des 2 points mesurés dans chaque expérience. Nous avons ainsi pu comparer directement l'induction par les protéines fusionnées avec leurs équivalents non fusionnés. Alors que la fusion de SUMO1 a très peu d'effet sur les capacités de transactivation de la protéine Tax, cette même fusion augmente légèrement l'activation de la voie NF- κ B par Tax-P79AQ81A (Figure 83B).

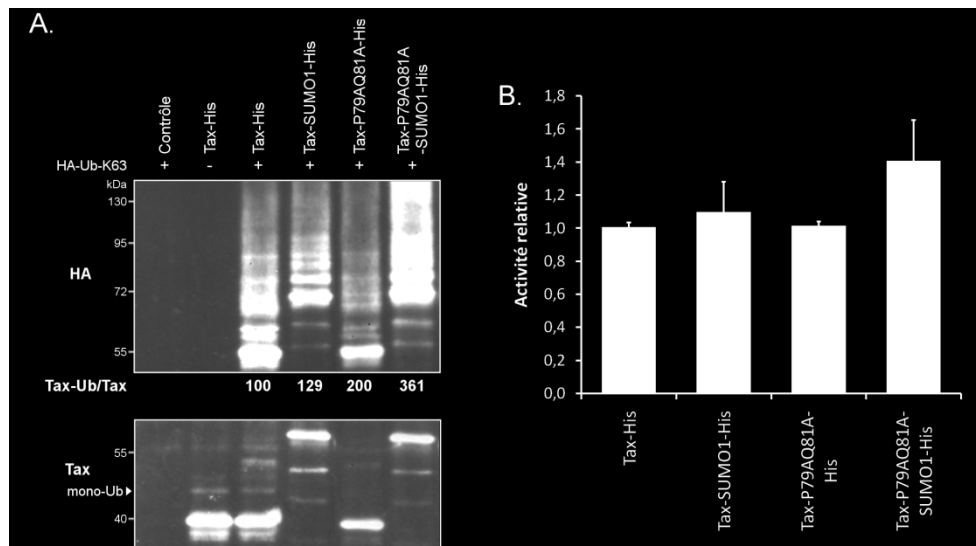


FIGURE 83 : LA FUSION DE SUMO1 AUGMENTE L'UBIQUITINYLATION DE TAX-P79AQ81A ET SA CAPACITE A TRANSACTIVER LES PROMOTEURS A ELEMENTS DE REPOSE κ B

A. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His fusionnées ou non à SUMO1 et une construction codant HA-ubiquitine K63, où toutes les lysines ont été mutées sauf la lysine 63. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-HA et un mélange de sérums de patients infectés par HTLV-1 (Tax). La quantification de l'ubiquitinylation de Tax détectée sur le panneau HA est normalisée sur la quantité de Tax non conjugué détectée sur le panneau Tax (Tax-Ub/Tax). L'ubiquitinylation de Tax sauvage est fixée à 100%.

B. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec une construction p κ B-Luc et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide codant la protéine Tax-His ou Tax-P79AQ81A-His fusionnée ou non à SUMO1. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase induite par les protéines non fusionnées a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes et SEM d'au moins 3 expériences indépendantes sont représentées.

L'ensemble de ces résultats montrent donc que, bien que la fusion de SUMO1 sur des protéines déficientes dans la formation de corps nucléaires puisse partiellement restaurer la formation de ces corps, ces derniers, très petits et ne contenant pas RelA, sont probablement non fonctionnels. Au contraire, la fusion de SUMO1 à Tax ou une protéine mutée favorise une localisation cytoplasmique de ces protéines associée à une stabilisation de la protéine et donc une accumulation plus importante dans les cellules. Mais de façon étonnante, seule l'ubiquitinylation d'une protéine mutée telle que Tax-P79AQ81A est augmentée en réponse à la fusion de SUMO1 mais pas celle de Tax-SUMO1. Cette augmentation de l'ubiquitinylation est, de façon cohérente, associée à une augmentation de l'activation de la voie NF- κ B.

L'ensemble de ces travaux démontrant l'absence de nécessité de formation des corps nucléaires et de SUMOylation de Tax pour activer la voie NF- κ B a fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Retrovirology* (Annexes).

III. LA PROTEINE TAX2 ACTIVE LA VOIE NF- κ B SANS UBIQUITINYLATION NI SUMOYLATION NI FORMATION DE CORPS NUCLEAIRES (ARTICLE 2)

En parallèle de notre étude sur le rôle de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation de Tax1 et sur l'influence de la localisation subcellulaire de Tax1 pour l'activation de la voie NF- κ B, nous avons cherché à répondre à ces mêmes questions pour la protéine Tax2 du virus HTLV-2 en collaboration avec l'équipe du Pr. Renaud Mahieux, à l'ENS Lyon.

A. LA PROTEINE TAX2 N'EST NI UBIQUITINYLEE NI SUMOYLEE DE FAÇON SIGNIFICATIVE

L'ubiquitinylation de Tax2 a été décrite dans des cellules 293T après transfection de ces cellules avec HA-Ubiquitine (Turci et al., 2009). Nous avons donc commencé par réaliser la même expérience en cellules HeLa. Ces cellules ont été co-transfectées avec un plasmide codant l'ubiquitine avec l'étiquette HA et un plasmide vide ou codant pour les protéines Tax1-His ou Tax2-His. Les protéines ont ensuite été purifiées sur résine de nickel et analysées par immunoblot avec les anticorps anti-HA et anti-His. Comme attendu, un fort signal ubiquitine est révélé avec l'anti-HA après purification de Tax1-His alors qu'aucun signal n'est détecté dans les cellules contrôles validant la spécificité du signal HA observé (**Figure 85A**, pistes 2 comparée à 1). La protéine Tax2B-His est exprimée et purifiée aussi efficacement que Tax1-His dans les cellules et un fort signal HA-Ub est effectivement associé à la protéine Tax2 (**Figure 85A**, piste 4). Pour valider le fait que le signal observé aussi bien pour Tax1 que pour Tax2 est bien la conséquence d'une ubiquitinylation de la protéine, nous avons également transfecté dans les cellules des constructions codant chacune des protéines avec toutes leurs lysines mutées en arginines et toujours une étiquette Histidine (Tax1-K0-His et Tax2-K0-His) (**Figure 84**). Les protéines sont bien purifiées sur la résine de nickel dans des proportions équivalentes à Tax1 et Tax2 mais aucun signal HA-Ubiquitine n'est détecté associé à ces protéines (**Figure 85A**, pistes 3 et 5). Les lysines de Tax1 et Tax2 peuvent donc être conjuguées à l'ubiquitine lorsque cette dernière est surexprimée dans les cellules.

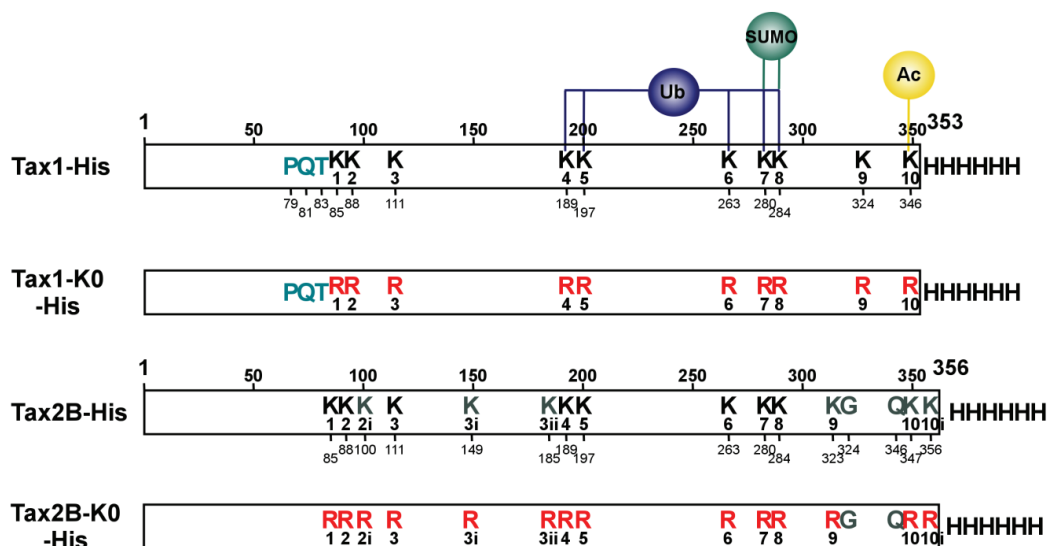


FIGURE 84 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE TAX1-HIS, TAX2-HIS ET LEURS MUTANTS

Le motif PxQxT (en bleu) et les différentes lysines sont indiqués avec leur position dans la séquence de Tax1. Les modifications post-traductionnelles qui touchent les résidus lysine sont également indiquées. Les lysines conservées dans la séquence de Tax2B sont indiquées en noir alors que les lysines non conservées sont en gris. Les mutants de Tax1 et Tax2B utilisés dans nos expériences sont présentés avec les résidus mutés qui apparaissent en rouge.

Comme l'ubiquitylation de Tax1 est également détectée en présence de la seule ubiquitine endogène, nous avons ensuite cherché à montrer l'ubiquitylation de Tax2 sans surexpression d'ubiquitine. Toujours dans des cellules HeLa, les protéines Tax1-His, Tax2-His et Tax2-K0-His ont été exprimées et purifiées. De façon surprenante, alors que l'ubiquitylation endogène de Tax1 est clairement détectée, aucun signal ubiquitine n'est associé à Tax2, pourtant purifiée dans les mêmes proportions que Tax1 (**Figure 85B**, panneaux Ub et His, piste 3 comparée à 2). Ceci est confirmé par le fait qu'en absence de lysines dans la protéine Tax2, le même signal de bruit de fond est détecté sur le panneau ubiquitine que pour la protéine Tax2 contenant toutes ses lysines (**Figure 85B**, panneau Ub, pistes 3 et 4). Ainsi, dans les cellules, la protéine Tax2 n'est en fait pas conjuguée à l'ubiquitine de façon endogène ou alors beaucoup trop faiblement pour pouvoir être détecté. De la même façon, alors que la conjugaison de Tax1 à des chaînes de SUMO2/3 est clairement détectée, aucun signal n'est détecté associé à Tax2 ou Tax2-K0 (**Figure 85B**, panneau SUMO). Les lysines de la protéine Tax2 semblent donc pouvoir être conjuguées au moins à l'ubiquitine, comme cela a été démontré en surexprimant l'ubiquitine, mais dans le contexte cellulaire avec des concentrations endogènes d'ubiquitine et de SUMO2/3, Tax2 n'est en fait ni ubiquitylée ni SUMOylée ou alors dans des proportions négligeables par rapport à Tax1.

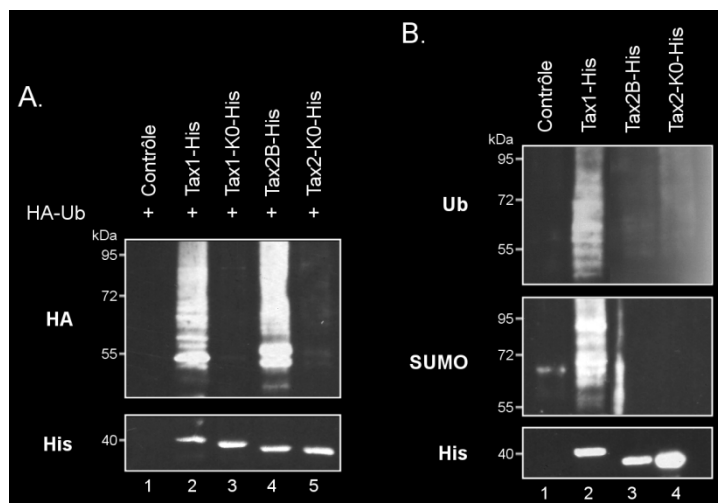


FIGURE 85 : UBIQUITINYLATION ET SUMOYLATION DE TAX2

A. Des cellules 293T ont été co-transfectées avec un plasmide codant HA-ubiquitine et un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax1-His ou Tax2B-His ou leurs équivalents avec toutes les lysines mutées Tax1-K0-His et Tax2-K0-His. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-His révélant les différentes protéines Tax.

B. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur vide (Contrôle) ou un vecteur codant la protéine Tax1-His ou Tax2B-His ou son équivalent avec toutes les lysines mutées Tax2-K0-His. Les lysats cellulaires ont été purifiés sur résine de nickel et les protéines purifiées ont ensuite été analysées par immunoblot avec des anticorps anti-ubiquitine, anti-SUMO2/3 et anti-His révélant les différentes protéines Tax.

B. LA PROTEINE TAX2 FORME TRES PEU DE CORPS NUCLEAIRES

Comme nous l'avons décrit pour le mutant de Tax1 Tax-P79AQ81A, le défaut de SUMOylation était corrélé à un défaut de formation des corps nucléaires. Nous avons donc, dans un deuxième temps, comparé la localisation subcellulaire de Tax1 et de Tax2. Des cellules ont donc été transfectées avec ces constructions codant ces deux protéines fusionnées à une étiquette Histidines, fixées et immunomarquées avec un anticorps anti-Histidine. Le signal observé dans les cellules transfectées par les constructions Tax est bien spécifique car seul un léger bruit de fond est observé dans les cellules contrôles (**Figure 86**, lignes 2 et 3 comparée à ligne 1). Comme décrit dans la partie précédente (II), le marquage de la protéine Tax1 se concentre dans des corps nucléaires et dans des agrégats périnucléaires (**Figure 86**, ligne 2). En dénombrant les cellules, nous avons pu évaluer à 70% la proportion de cellules exprimant Tax1 qui présentent des corps nucléaires. Les résultats obtenus après marquage avec l'anticorps anti-histidine sont donc les mêmes qu'après marquage avec un anticorps monoclonal anti-Tax1 (**Figure 69A**), validant ainsi l'anticorps utilisé pour le marquage notamment des corps nucléaires. Le marquage des cellules exprimant Tax2 révèle sa présence essentiellement dans le cytoplasme comme cela avait été

précédemment décrit (Meertens et al., 2004; Sheehy et al., 2006). Des agrégats importants sont le plus souvent observés en périphérie des noyaux (**Figure 86**, ligne 3). Par contre, des corps nucléaires tels que décrits pour Tax1 sont très rarement observés dans les cellules exprimant Tax2. La protéine Tax2 est quand même présente dans le noyau et souvent le marquage nucléaire se révèle malgré tout hétérogène avec dans environ 20% des cellules des spots un peu plus nets qui pourraient correspondre à des corps nucléaires Tax2 mais qui sont dans tous les cas différents des corps nucléaires Tax1 (**Figure 86**, ligne 4). Ces observations ont donc montré que, bien que Tax2 semble capable de former quelques agrégats dans le noyau, cette protéine ne forme pas de corps nucléaires bien définis tels qu'ils ont été décrits dans le noyau des cellules transfectées avec une construction Tax1. Par contre, malgré son défaut d'ubiquitylation comparé à Tax1, Tax2 forme des agrégats périnucléaires souvent plus larges que ceux observés dans les cellules Tax1.

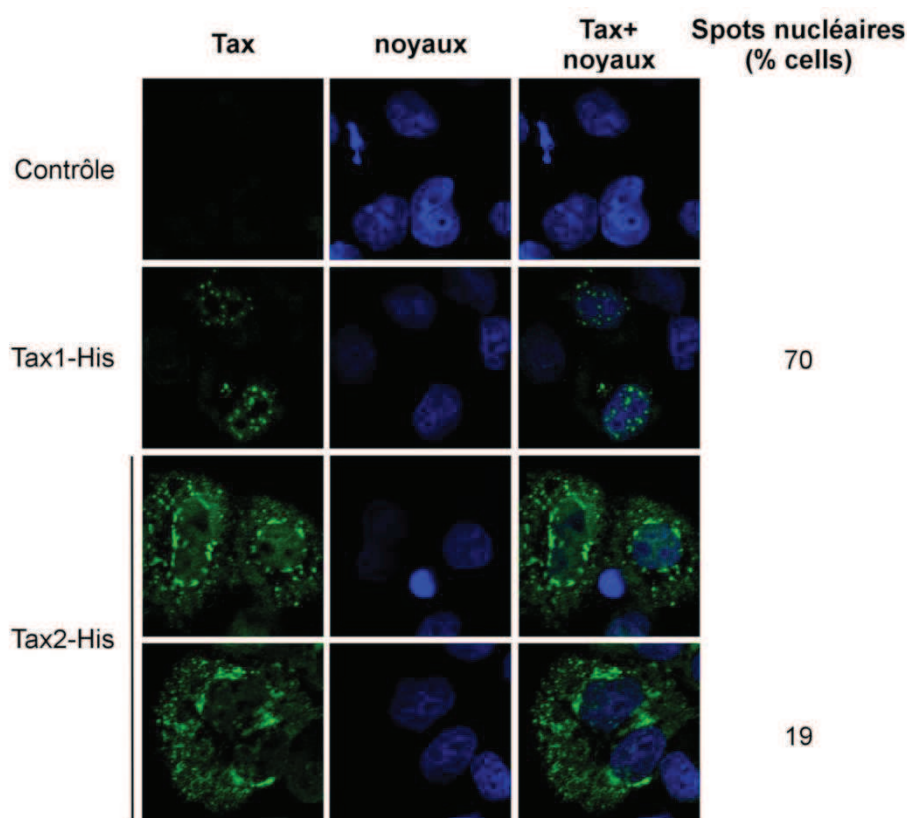


FIGURE 86 : LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE TAX2

Des cellules HeLa cultivées sur lamelles de verre, ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax1-His ou Tax2B-His. 24h après la transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-His (vert). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale et les cellules présentant des tâches nettes dans le noyau ont été dénombrées. En rapportant ce nombre au nombre de cellules positives pour le marquage Tax on obtient le pourcentage de cellules dans lesquelles Tax forment ce que l'on a appelé des spots nucléaires. Ce pourcentage est indiqué à droite des images. Au moins 100 cellules ont été analysées dans chaque condition.

C. LA PROTEINE TAX2 ACTIVE LA VOIE NF- κ B

La question de la fonctionnalité des agrégats périnucléaires formés par Tax2, notamment en matière de recrutement du complexe IKK, s'est ensuite posée puisque cette fonction est corrélée à l'ubiquitinylation dans le cas de la protéine Tax1.

L'interaction avec NEMO, la sous-unité régulatrice du complexe IKK, qui, dans le cas de Tax1 dépend de son ubiquitinylation, a d'abord été analysée. Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées dans des cellules HeLa. Pour pouvoir déterminer si l'ubiquitinylation est effectivement nécessaire à l'interaction avec NEMO, des plasmides codant les protéines Tax1-His et Tax2B-His mais également les protéines Tax1-K0-His et Tax2-K0-His, protéines dont nous avons vérifié qu'elles ne pouvaient pas être ubiquitinylées (**Figure 85A**), ont été transfectées dans les cellules. Ces protéines ont ensuite été immunoprécipitées grâce à un anticorps anti-Histidines. NEMO est co-immunoprécipité avec Tax1-His mais pas avec Tax-M22-His, utilisé comme contrôle négatif (**Figure 87A**). Alors que la protéine Tax1-K0-His est bien immunoprécipitée par l'anticorps anti-Histidine, NEMO n'est pas co-immunoprécipité avec cette protéine, confirmant le besoin de l'ubiquitinylation de Tax1 pour interagir avec NEMO. Par contre, aussi bien Tax2 que Tax2-K0 co-immunoprécipitent NEMO (**Figure 87A**). Ainsi, Tax2 est capable d'interagir avec NEMO indépendamment d'une conjugaison à des chaînes d'ubiquitine. Confirmant l'interaction avec NEMO, les protéines Tax1, Tax2 et Tax2-K0 sont également capables de co-immunoprécipiter les sous-unités catalytiques du complexe IKK activé : IKK α et β phosphorylés. Pour confirmer la différence entre Tax1 et Tax2, nous avons mesuré l'interaction de ces protéines avec IKK α et β et fixé cette interaction à 100%. Nous avons ensuite comparé cette interaction avec leurs équivalents sans lysine. Contrairement à Tax1-K0 qui est incapable d'interagir avec le complexe IKK, Tax2B-K0 est capable d'interagir avec IKK α et β à hauteur d'environ 40% comparé à Tax2 (**Figure 87A**). L'ensemble de ses résultats confirment que Tax2 est capable d'interagir avec le complexe IKK malgré son défaut d'ubiquitinylation et doit donc utiliser un mécanisme d'interaction différent de Tax1.

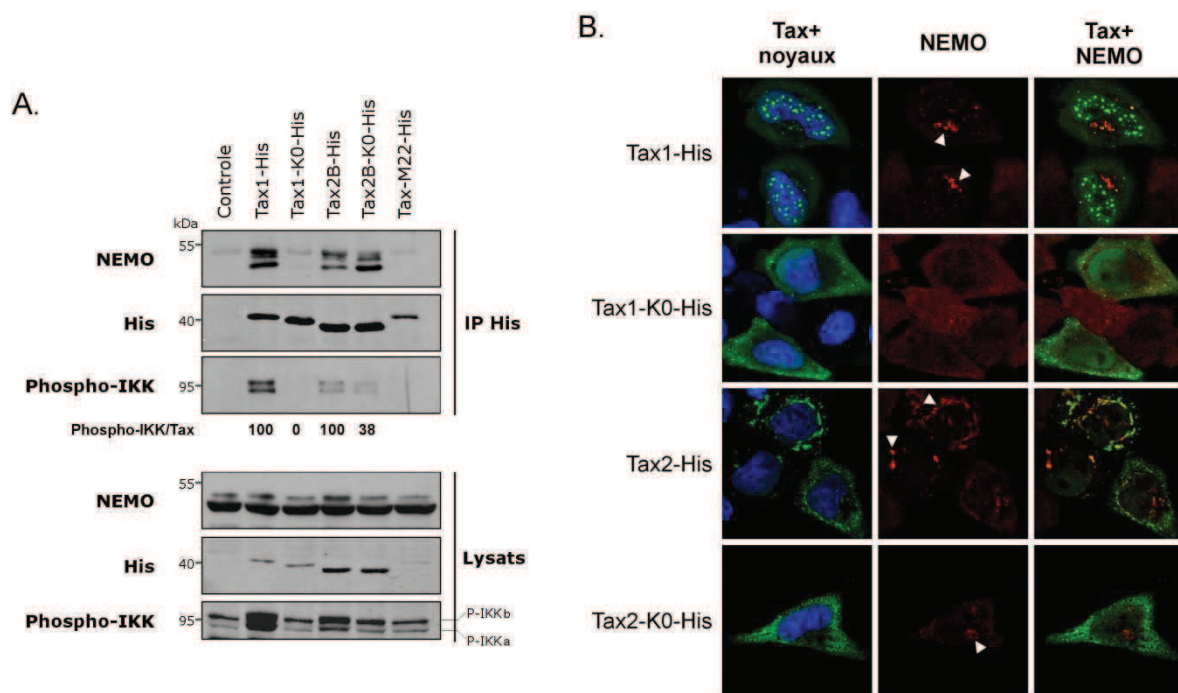


FIGURE 87 : TAX2 INTERAGIT ET RELOCALISE NEMO INDEPENDAMMENT DE L'UBIQUITINE

A. Des cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide vide ou un plasmide codant les protéines Tax1-His ou Tax2-His ou leurs équivalents sans lysines (K0). Les cellules ont été lysées 24h après la transfection et une partie des lysats a été incubée toute la nuit avec des anticorps anti-His. L'incubation avec des billes de sépharose recouvertes de protéines G pendant 1h a ensuite permis de récupérer les complexes immuns. Après élution, les fractions immunoprécipitées ou les lysats totaux sont analysées par immunoblot avec un anticorps anti-NEMO, un anticorps anti-Histidine et un anticorps dirigé spécifiquement contre les formes phosphorylées de IKK α et β . Les formes IKK α et β phosphorylés dans les fractions immunoprécipitées ont été quantifiés et normalisés sur la quantité de Tax immunoprécipité dans chaque fraction (Phospho-IKK/Tax). Le 100% a été fixé indépendamment pour la protéine Tax1-His et Tax2-His.

B. Des cellules HeLa cultivées sur lamelles de verre, ont été transfectées avec un plasmide vide ou codant la protéine Tax1-His ou Tax2B-His ou leurs équivalents sans lysine. 24h après la transfection, les cellules ont été fixées puis immunomarquées avec un anticorps anti-His (vert) et un anticorps anti-NEMO (rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Les cellules ont été observées en microscopie confocale. Les têtes de flèches indiquent les agrégats périnucléaires où est relocalisé NEMO.

Pour savoir si cette interaction de Tax2 avec le complexe IKK était capable d'induire la relocalisation du complexe comme dans le cas de Tax1, nous avons observé en immunofluorescence les protéines Tax1 et Tax2, ainsi que leurs équivalents sans lysine, et la protéine NEMO. Dans les cellules qui expriment Tax1-K0 présent de façon diffuse dans le cytoplasme et le noyau et incapable d'interagir avec NEMO, le marquage de NEMO est diffus surtout dans le cytoplasme des cellules (**Figure 87B**, ligne 2). Par contre, quand Tax1 est exprimé dans les cellules, NEMO est essentiellement relocalisé dans les agrégats périnucléaires mais aussi dans les corps nucléaires quand ils sont présents (**Figure 87B**, ligne 1). NEMO est également relocalisé dans les agrégats périnucléaires formés par Tax2 (**Figure**

87B, ligne 3). Enfin, la localisation subcellulaire de Tax2-K0 est altérée par rapport à Tax2 puisque le marquage dans les cellules exprimant ce mutant, même s'il reste essentiellement cytoplasmique comme dans le cas de Tax2, est surtout diffus. Malgré cela, Tax2-K0 est capable d'induire une relocalisation de NEMO en périphérie du noyau (**Figure 87B**, ligne 4).

Ainsi, Tax2 est non seulement capable d'interagir avec le complexe IKK mais également d'induire sa relocalisation dans des agrégats périnucléaires, de manière indépendante d'une conjugaison à l'ubiquitine.

La relocalisation du complexe IKK par Tax2 suppose une activation de la voie NF- κ B canonique. Pour le vérifier, nous avons effectué un test de transactivation de promoteurs. Dans des cellules HeLa, Tax2 et Tax2-K0 induisent de façon équivalente à Tax1 la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B (**Figure 88A**). Pourtant Tax2-K0 semble moins efficace pour activer la transcription des promoteurs à éléments de réponse CRE que Tax2, suggérant un léger défaut d'expression ou de conformation (**Figure 88B**). Ces résultats confirment donc que Tax2 est capable d'activer la voie NF- κ B en absence d'une conjugaison à l'ubiquitine. Les mutants Tax-M22 et Tax-M47 permettent toujours de valider les résultats puisque, comme attendu, ils n'activent, respectivement, que la voie NF- κ B ou que la voie CREB (**Figure 88**).

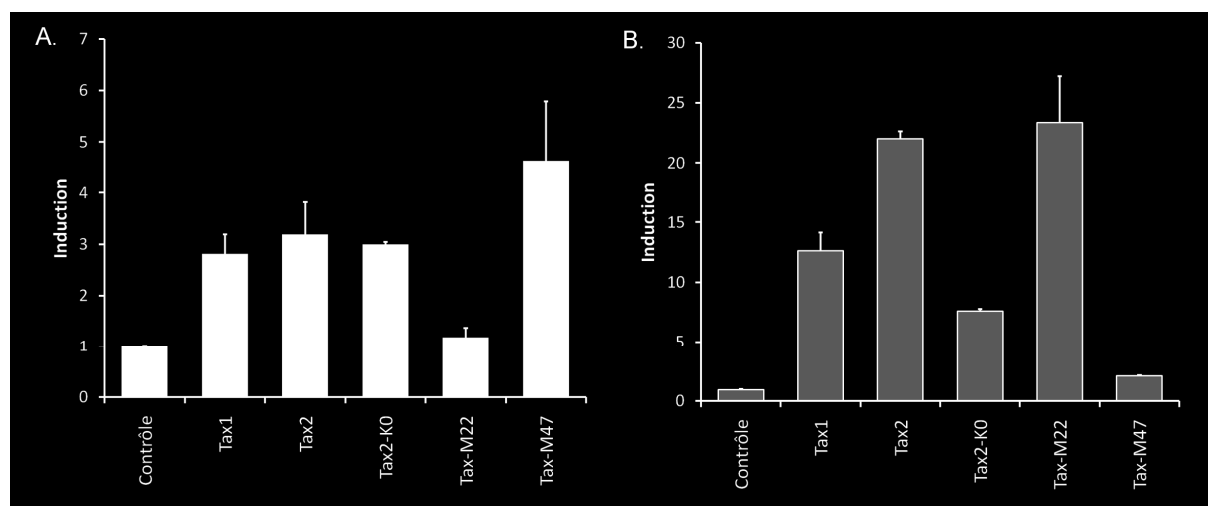


FIGURE 88 : TAX2 ACTIVE LA TRANSCRIPTION D'UN PROMOTEUR A ELEMENTS DE REPONSE κ B INDEPENDAMMENT DE L'UBIQUITINE

A. et B. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec une construction p κ B-Luc (**A.**) ou pLTR-Luc (**B.**) et une construction pRL-TK. Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide vide (Contrôle) ou un plasmide codant la protéine Tax1-His, Tax2-His, Tax2-K0-His, Tax-M22-His et Tax-M47-His. 24h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase, a été mesurée au luminomètre et normalisée. Pour chaque expérience, les points ont été réalisés en double. L'activité luciférase basale dans les cellules contrôles a été fixée à 1 pour l'un des 2 points mesurés. Les moyennes des 2 points d'une expérience représentative sont représentées et les barres d'erreurs représentent les SEM.

Tous ces résultats démontrent que la protéine Tax2, en n'étant ni ubiquitinylée ni SUMOylée, ou dans des proportions très négligeables comparées à Tax1, et incapable de former des corps nucléaires tels que ceux décrits pour Tax1, active malgré tout de façon efficace la voie NF- κ B canonique. Notamment Tax2 est capable d'interagir avec le complexe IKK et de le relocaliser, alors que cette fonction avait été précédemment associée à l'ubiquitinylation de Tax1 suggérant un mécanisme différent d'activation de la voie NF- κ B canonique par Tax1 et par Tax2.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication actuellement en révision à *Journal of Virology* (10/09/12) (Annexes).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La protéine Tax est considérée comme un facteur clé de la pathogenèse, et notamment des propriétés transformantes, du virus HTLV-1. Parmi les nombreuses dérégulations induites par Tax dans les cellules, l'activation constitutive de la voie NF- κ B est particulièrement incriminée et nécessaire à la prolifération et l'immortalisation des cellules. Il est donc nécessaire de déterminer précisément les mécanismes moléculaires d'activation de cette voie par Tax pour pouvoir envisager par la suite de la bloquer dans un but thérapeutique. De plus, cela pourrait nous permettre de mettre en évidence des mécanismes généraux de dérégulation de la voie NF- κ B qui pourraient être impliqués dans d'autres cancers (Chaturvedi et al., 2011; Xiao and Fu, 2011). De nombreuses études ont déjà permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'activation des voies NF- κ B, aussi bien canonique qu'alterne, par Tax et d'établir un premier modèle (**Figure 54**). Dans ce modèle, Tax agit à la fois dans le cytoplasme, et plus précisément au niveau d'agrégats périnucléaires, grâce à sa conjugaison à des chaînes d'ubiquitine K63, et dans le noyau, au niveau des corps nucléaires, sous forme SUMOylée. Au laboratoire, notre objectif est de mieux caractériser le rôle de chacune de ces modifications post-traductionnelles de Tax, leur régulation et leur lien avec la localisation subcellulaire de Tax et d'élargir nos connaissances à Tax2. Cette protéine est en effet capable d'activer la voie NF- κ B canonique mais les mécanismes régulateurs sont encore mal compris.

Au cours de ce travail de thèse, l'ensemble des résultats obtenus nous ont amené à repenser le modèle actuel d'activation de la voie NF- κ B par Tax. Nous avons en effet montré que la SUMOylation de Tax1 et la formation de corps nucléaires ne sont pas nécessaires à l'activation de cette voie. Au contraire, l'ubiquitinylation de Tax1 est essentielle et est corrélée à sa capacité d'activer non seulement le complexe IKK mais aussi la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B. Nos résultats ont également montré que le modèle établi pour Tax1 n'était pas généralisable à Tax2 puisqu'un mutant de Tax2 sans lysine, donc non ubiquitinylable, est toujours capable d'activer le complexe IKK et la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B.

Ces résultats posent donc de nouvelles questions, notamment sur l'importance des corps nucléaires et de la SUMOylation de Tax dans la pathogenèse de HTLV-1 mais également les différences entre Tax1 et Tax2 qui sont à l'origine des mécanismes d'activation différents de la voie NF- κ B canonique.

I. L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX : L'UBIQUITINYLATION ET LA PHASE CYTOPLASMIQUE AU CŒUR D'UN NOUVEAU MODELE

Au cours de nos études, nous avons identifié un nouveau mutant de Tax, Tax-P79AQ81A, qui s'est révélé un outil très intéressant car il nous a permis d'étudier de façon séparée le rôle de l'ubiquitinylation de Tax d'une part et de sa SUMOylation d'autre part. En effet, le mutant Tax-P79AQ81A n'a pas de problème d'ubiquitinylation, en particulier de conjugaison aux chaînes d'ubiquitine liées en K63 alors qu'il présente un défaut très sévère de SUMOylation aussi bien par SUMO1 que par SUMO2/3. Ce phénotype est unique car jusqu'à présent, les principaux mutants de Tax utilisés pour décortiquer le rôle des modifications post-traductionnelles de Tax dans la voie NF- κ B et aboutir au modèle présenté sur la **Figure 54** ont été les mutants de lysines.

A. LES MUTANTS DE LYSINES A L'ORIGINE DU MODELE ACTUEL : DES MUTANTS A DOUBLE TRANCHANT.

Ces mutants ont été obtenus en modifiant différentes combinaisons de lysines parmi les 10 que compte la protéine Tax. Ils ont notamment permis de déterminer les lysines cibles de l'ubiquitinylation et de la SUMOylation (Chiari et al., 2004; Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Or ces deux modifications post-traductionnelles ciblent en partie les mêmes lysines puisque les lysines 4 à 8 ont été impliquées dans l'ubiquitinylation de Tax alors que les lysines 7 et 8 principalement ont été impliquées dans sa SUMOylation. Ainsi, la mutation des lysines 4 à 8 (Tax-K4-8R) pour empêcher l'ubiquitinylation de Tax implique également le blocage de la SUMOylation de Tax. Inversement, la mutation des lysines 7 et 8 (Tax-K7-8R ou Tax-R4-6K) pour inhiber la SUMOylation de Tax affecte au moins partiellement son ubiquitinylation (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). C'est également le cas du mutant Tax-K7R qui, bien que se rapprochant du phénotype de Tax-P79AQ81A présente quand même un léger défaut d'ubiquitinylation (**Tableau 4**).

Aussi bien pour Tax-K4-8R que K7-8R, la capacité à activer la voie NF- κ B était fortement altérée, démontrant l'importance de ces lysines C-terminales de Tax dans son activité transactivatrice des promoteurs dépendants de NF- κ B (**Tableau 4**). Ces mutants ont donc permis de suggérer un rôle des modifications post-traductionnelles de Tax dans

l'activation de la voie NF- κ B mais sans pouvoir discriminer l'influence de l'ubiquitylation de celle de la SUMOylation. Pour répondre à cette question, ces mutants ont été fusionnés à des polypeptides ubiquitine ou SUMO1.

B. LES PROTEINES DE FUSION A L'UBIQUITINE OU SUMO : UN RISQUE D'ARTEFACT

1. LES PROTEINES DE FUSION ET LE ROLE DE L'UBIQUITINYLATION ET DE LA SUMOYLATION DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

Le modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B par Tax et du rôle de chacune des modifications post-traductionnelles dans cette activation résulte essentiellement des données obtenues avec la protéine de fusion à l'ubiquitine, Tax-K4-8R-Ub, et les protéines de fusion à SUMO1, Tax-K6-8R-SUMO1 ou Tax-R4-6K-SUMO1. Ces protéines ont été construites dans le but de pallier au défaut respectivement d'ubiquitylation et de SUMOylation de ces mutants. La fusion à l'ubiquitine a en effet redonné la capacité au mutant Tax-K4-8R d'induire la translocation nucléaire de RelA sans pour autant permettre la transactivation des promoteurs à éléments de réponse NF- κ B, suggérant que l'ubiquitylation de Tax était nécessaire mais pas suffisante pour activer complètement la voie NF- κ B. Au contraire les mutants Tax-K6-8R ou Tax-R4-6K, présentant au départ un défaut de transactivation des promoteurs dépendants de NF- κ B, voyaient leur activité au moins partiellement restaurée suite à leur fusion à SUMO1. La fusion à SUMO1 restaurait également partiellement la capacité de Tax-K6-8R et Tax-R4-6K à former des corps nucléaires (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Ainsi l'ubiquitylation de Tax a été associée à l'activation du complexe IKK dans le cytoplasme, induisant la translocation nucléaire de RelA, alors que la SUMOylation de Tax a été associée à une action de Tax dans les corps nucléaires directement au niveau des promoteurs, les deux modifications permettant ainsi une activation optimale de la voie NF- κ B.

2. RECONCILIATION DE NOS RESULTATS AVEC LES RESULTATS OBTENUS PRECEDEMMENT

Les résultats obtenus avec notre mutant Tax-P79AQ81A sont donc en contradiction avec nos données précédentes puisque sa seule ubiquitylation suffit à transactiver

efficacement les promoteurs à éléments de réponse κ B sans besoin de SUMOylation ou de corps nucléaires. De plus nous avons confirmé ces résultats avec un échantillon de mutants de lysines en démontrant une corrélation entre leur niveau d'ubiquitylation et leur capacité à activer le complexe IKK, comme attendu, mais également leur capacité à transactiver les promoteurs dépendants de NF- κ B. Au contraire, leur niveau de SUMOylation n'est pas lié à leur activité NF- κ B.

Or, de façon intéressante, nous avons montré que la fusion de SUMO1 à Tax-P79AQ81A induisait une augmentation de son ubiquitylation et notamment par des chaînes K63 (**Figure 83A**). Cette augmentation de l'ubiquitylation de Tax-P79AQ81A-SUMO1 est associée à une augmentation de la localisation cytoplasmique de la protéine et une légère augmentation de l'activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B. Ces résultats rappellent fortement ceux décrits très récemment par Fryrear *et al.* dans lesquels, une ubiquitine ligase ciblant les protéines SUMOylées (STUbL), RNF4, est capable d'ubiquityler Tax fusionné à SUMO1 *in vitro*. De plus, la surexpression de RNF4 favorise une localisation cytoplasmique de Tax-GFP et augmente son activité NF- κ B (Fryrear *et al.*, 2012). Ainsi la fusion de SUMO1 au mutant Tax-K6-8R ou Tax-R4-6K pourrait également résulter en une augmentation de son ubiquitylation, par l'intermédiaire de RNF4 ou une autre STUbL, qui se traduirait par une augmentation de sa capacité à activer la transcription des promoteurs à éléments de réponse κ B. Cette augmentation de l'ubiquitylation de Tax-R4-6K après fusion à SUMO1 est d'ailleurs nettement visible dans l'étude de Lamsoul *et al.* (Lamsoul *et al.*, 2005). Ainsi, l'effet de la fusion de SUMO1 que l'on pensait compenser le défaut de SUMOylation, compenserait en fait le défaut d'ubiquitylation de Tax-K6-8R ou Tax-R4-6K en favorisant l'ubiquitylation de Tax sur ses lysines non mutées, K4 et K5 ou K4, K5 et K6, respectivement. Ce modèle permet donc de réconcilier nos résultats avec les résultats obtenus avec les fusions à SUMO1, l'ubiquitylation étant dans les deux cas au cœur de l'activation de la voie NF- κ B.

Un autre argument en faveur de ce modèle est qu'il expliquerait également pourquoi Lamsoul *et al.* ont observé l'induction de la translocation nucléaire de RelA par le mutant Tax-K4-8R fusionné à SUMO1. En effet, ce mutant n'est ni ubiquitylé ni SUMOylé et dans l'hypothèse où la fusion de SUMO1 pallierait à un défaut de SUMOylation, il est difficile de comprendre pourquoi Tax-K4-8R-SUMO1 activerait le complexe IKK alors que

l'ubiquitinylation de Tax a été reconnue nécessaire pour l'interaction avec NEMO. Contrairement au rôle de la SUMOylation de Tax, l'importance de l'ubiquitinylation de Tax dans le recrutement et l'activation du complexe IKK n'a pas seulement été mise en évidence grâce à des mutants de lysines, qui posent le problème du défaut de SUMOylation associé au défaut d'ubiquitinylation, mais également en inhibant spécifiquement l'ubiquitinylation par ARN interférence dirigée contre l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine (E2) Ubc13, spécifique de Tax (Harhaj et al., 2007; Kfoury et al., 2008; Nasr et al., 2006; Shembade et al., 2007). Par contre, dans notre modèle où une STUbL ubiquitylerait Tax-K4-8R-SUMO1, cette protéine pourrait alors logiquement activer le complexe IKK. Reste le problème qu'avec ce mutant de Tax, toutes les lysines normalement ciblées par les chaînes d'ubiquitine sont mutées. Cependant, une légère ubiquitinylation de Tax-K4-8R-SUMO1 est visible comparé à Tax-K4-8R (Lamsoul et al., 2005). Il est envisageable que dans des conditions particulières d'autres lysines de Tax puissent être utilisées pour la conjugaison de chaînes d'ubiquitine. Une étude a en effet montré que, malgré la mutation de toutes les lysines cibles de l'ubiquitinylation, identifiées par spectrométrie de masse, la protéine de matrice d'un paramyxovirus était toujours ubiquitylée et fonctionnelle, suggérant la conjugaison de l'ubiquitine sur des sites alternatifs (Harrison et al., 2012). De plus, les lysines de Tax ciblées par RNF4 n'ont pas été identifiées et pourraient être différentes des sites majeurs d'ubiquitinylation identifiés. Notamment, il a été montré que l'ubiquitine ligase RNF4 ubiquityle les lysines des polypeptides SUMO1 et pourrait donc cibler les lysines de la partie SUMO1 des protéines de fusion en absence des lysines cibles de Tax (Tatham et al., 2008).

La conjugaison d'ubiquitine à des sites différents des lysines K4 à K8 identifiées comme les cibles majeures pour la conjugaison des chaînes d'ubiquitine suggère que RNF4 n'est pas l'ubiquitine ligase classique impliquée dans l'ubiquitinylation de Tax mais interviendrait dans des conditions bien particulières. C'est effectivement ce que suggèrent nos résultats.

3. RNF4, UNE ENZYME OCCASIONNELLE DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

Le premier argument qui suggère que RNF4 n'est pas l'ubiquitine ligase attitrée de Tax est qu'elle est plutôt connue pour fonctionner avec l'enzyme de conjugaison (E2) UbcH5a et non avec Ubc13 (Plechanovova et al., 2012).

Ensuite, nos résultats montrent clairement que la SUMOylation n'est pas requise pour l'ubiquitinylation de Tax. Le mutant Tax-P79AQ81A est en effet ubiquitinylé de façon équivalente à Tax bien que présentant une réduction de sa SUMOylation d'environ 80%.

Enfin, alors que Fryrear *et al.* ont montré par un test d'ubiquitinylation *in vitro* que RNF4 pouvait effectivement ubiquitinyler Tax fusionnée à SUMO1, la protéine Tax sauvage fusionnée à SUMO1 ne présente pas d'augmentation de son ubiquitinylation dans nos expériences, contrairement aux protéines Tax mutées (**Figure 83A**). Pourtant la diminution de l'expression de RNF4 dans des cellules exprimant Tax diminue l'ubiquitinylation de Tax, suggérant que RNF4 est nécessaire à l'ubiquitinylation générale de Tax (Fryrear *et al.*, 2012). Des différences de conditions expérimentales peuvent expliquer ces différences de résultats. Tout d'abord, nous avons utilisé une protéine possédant uniquement une étiquette 6-Histidines en C-terminal dans des cellules HeLa alors que Fryrear *et al.* ont utilisé une protéine avec une étiquette S (polypeptide S de la Subtilisine) en N-terminal et une protéine GFP (238 aa) fusionnée en C-terminal. Mais surtout, alors que nous avons transfecté dans les cellules une construction codant HA-ubiquitine K63 (ne conservant que sa lysine K63) et donc détecté uniquement les chaînes d'ubiquitine K63 conjuguées à Tax-SUMO1, Fryrear *et al.* ont transfecté une protéine HA-ubiquitine pouvant établir toutes les liaisons possibles et en présence de MG-132, un inhibiteur du protéasome (Fryrear *et al.*, 2012). Il est donc possible que la perte d'ubiquitinylation de Tax observée lorsque l'expression de RNF4 est diminuée dans les cellules soit due à une perte de conjugaison à des chaînes autres que des chaînes K63, ce qui expliquerait que nous n'ayons pas d'effet de la fusion de SUMO1 à Tax sauvage sur son ubiquitinylation par les chaînes K63. L'ubiquitine ligase RNF4 est d'ailleurs connue pour favoriser la dégradation de protéines, notamment de la protéine PML, grâce à la conjugaison de chaînes K48 sur ses substrats même si dernièrement, la conjugaison de chaînes K63 par cette protéine a été mise en évidence au niveau des foyers de réparation de l'ADN (Lallemant-Breitenbach *et al.*, 2008; Tatham *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012).

Ainsi, la protéine RNF4 pourrait être recrutée sur la protéine Tax seulement dans des conditions particulières, notamment en cas de stress génotoxique. L'inhibition de l'expression de RNF4 dans les cellules bloque en effet l'export nucléaire de Tax observé en cas d'irradiation des cellules aux UV (Fryrear *et al.*, 2012). RNF4 pourrait alors induire la monoubiquitinylation de Tax sur les lysines 7 et 8 qui a été décrite en réponse à ce même stress (Gatza *et al.*, 2007). Dans le cas d'une fusion de Tax à SUMO1, ce recrutement pourrait

être forcé et induire l'ubiquitylation des protéines Tax mutées et déficientes en SUMOylation (Tax-K4-8R, Tax-K6-8R et Tax-P79AQ81A). Dans le cas de la protéine Tax sauvage fusionnée à SUMO1 par contre, la conjugaison de Tax à des chaînes de SUMO endogène sur les lysines 7 et 8 pourrait bloquer l'interaction avec RNF4 empêchant ainsi son action en absence de stress génotoxique. Sur des protéines recombinantes SUMO-T7-Tax produites en bactéries qui ne possèdent pas de gènes *SUMO*, ces chaînes de SUMOylation endogènes sont absentes, ce qui explique que RNF4 puisse ubiquityler cette fusion SUMO-Tax *in vitro*.

4. DES FUSIONS DIRECTEMENT SUR LES LYSINES DES PROTEINES : UN OUTIL D'AVENIR

La fusion de Tax à l'ubiquitine et à SUMO1 peut donc mener à des artéfacts et favoriser des interactions qui n'existent pas avec la protéine Tax sauvage. En effet, ces fusions peuvent en partie pallier au défaut de conjugaison des mutants à des chaînes d'ubiquitine ou de SUMO endogène, en permettant notamment la formation de chaînes sur les lysines de ces polypeptides présents à l'extrémité C-terminale de Tax. Cependant, une protéine dans la cellule n'est pas linéaire mais adopte une conformation 3D particulière. Or la formation de chaînes en C-terminal de la protéine ne permet pas forcément les mêmes interactions qu'avec des chaînes conjuguées sur les résidus lysines au cœur de la protéine. Il serait préférable biologiquement de conjuguer des protéines ubiquitine ou SUMO directement sur les lysines qui ont été identifiées comme les cibles de telles modifications. Plusieurs études ont permis la formation de tels conjugués mais en utilisant une liaison artificielle, telle qu'un pont disulfure, pour fixer l'ubiquitine sur le substrat. Cependant une étude a récemment montré qu'il était possible de conjuguer une ubiquitine sur un résidu lysine via une liaison isopeptidique naturelle, c'est-à-dire conformément à ce qui est observé *in vivo* (Virdee et al., 2011). L'utilisation de telles protéines recombinante de Tax pourrait un jour nous éclairer sur l'importance de la modification de telle ou telle lysine de Tax.

C. L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B CANONIQUE PAR TAX EST DEPENDANTE DE L'UBIQUITINYLATION DE TAX

Nous avons montré que le mutant Tax-P79AQ81A pouvait transactiver les promoteurs à éléments de réponse κ B indépendamment de la SUMOylation et de la formation des corps

nucléaires. L'ubiquitinylation de Tax est donc suffisante pour activer complètement la voie NF- κ B. Ces résultats ont été confirmés en démontrant l'existence d'une corrélation directe entre le niveau d'ubiquitinylation et la capacité à activer la transcription des promoteurs dépendants de NF- κ B (**Figure 80**). En effet, le coefficient de détermination R^2 nous indique que 94% de la variabilité d'induction de la voie NF- κ B est expliqué par l'ubiquitinylation de Tax. L'ubiquitinylation de Tax étant associée à une localisation cytoplasmique, l'essentiel de l'activation de la voie NF- κ B semble donc se faire dans le cytoplasme.

1. L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX EST ESSENTIELLEMENT LOCALISEE DANS LE CYTOPLASME

Dans le modèle actuel, Tax a un effet essentiel sur la voie NF- κ B dans le cytoplasme, l'activation du complexe IKK qui permet la translocation nucléaire des dimères NF- κ B et leur fixation sur des promoteurs cibles. Nous avons confirmé cet effet de Tax et la relocalisation du complexe IKK dans les agrégats périnucléaires (**Figure 71**). Nous avons également confirmé que cet effet activateur de Tax est lié à son ubiquitinylation puisque 94% de la variabilité observée pour l'interaction et l'activation du complexe IKK est dépendante de l'ubiquitinylation de Tax d'après la régression linéaire (**Figure 78**). En réalisant une régression linéaire entre la capacité des différents mutants à transactiver les promoteurs à éléments de réponse κ B et leur capacité à activer leur complexe IKK, nous pouvons démontrer que la première dépend essentiellement de la deuxième (94%). L'activation du complexe IKK est donc cruciale pour la transactivation des promoteurs.

Avant les études décrivant le rôle de la SUMOylation et des corps nucléaires, l'activation de la voie NF- κ B par Tax avait d'ailleurs été localisée uniquement dans le cytoplasme. En effet, Nicot *et al.* ont montré que des mutants délétés de leur signal de localisation nucléaire (Tax- Δ N81 et Tax- Δ N109) et donc localisés uniquement dans le cytoplasme étaient capables d'induire la transactivation d'un promoteur à éléments de réponse κ B placé en amont du gène rapporteur codant la Chloramphénicol AcétylTransférase (Nicot *et al.*, 1998). Ainsi la présence de Tax uniquement dans le cytoplasme peut être suffisante à l'activation de la voie NF- κ B complète.

De plus, plusieurs études ont récemment montré une association entre l'augmentation de la localisation cytoplasmique de Tax et l'augmentation de sa capacité à transactiver les

promoteurs dépendants de NF- κ B sous l'influence de différents facteurs : RNF4, SMYD3 ou STAMBPL1 (Fryrear et al., 2012; Lavorgna and Harhaj, 2012; Yamamoto et al., 2011). Les résultats de ces études sont donc cohérents avec notre conclusion que l'étape cruciale de l'activation de la voie NF- κ B se situe dans le cytoplasme et est donc essentiellement dépendante de l'ubiquitinylation de Tax. Surtout l'activation de la voie NF- κ B dans le cytoplasme est suffisante pour induire des effets sur la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B.

Est-ce que cela signifie pour autant que Tax n'a aucun effet dans le noyau ?

2. UN EFFET ACTIVATEUR DE TAX DANS LE NOYAU ?

Le fait est que la translocation de RelA dans le noyau ne suffit pas à l'activation de la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B comme le montre l'étude du mutant Tax-K4-8R-Ub (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Il est donc probable que Tax ait un autre effet activateur, dans le noyau probablement.

Tax pourrait avoir un effet dans le noyau de façon indirecte et dépendante de son ubiquitinylation, ce qui expliquerait le rôle crucial de l'ubiquitinylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B. En effet, il a été montré que l'ubiquitinylation de Tax était nécessaire pour la translocation et la SUMOylation de NEMO dans le noyau (Kfoury et al., 2011). Même si le rôle de NEMO dans le noyau n'est pas encore bien compris, sa présence pourrait être un élément important de la transactivation des promoteurs dépendants de NF- κ B. Cependant, le mutant Tax-K4-8R-Ub est capable d'induire l'accumulation et la SUMOylation de NEMO dans le noyau (Kfoury et al., 2011). Ce n'est donc pas l'élément manquant pour l'activation des promoteurs par ce mutant.

Puisqu'il a été montré que Tax est retrouvé sur les promoteurs à éléments de réponse κ B et peut interagir directement avec les dimères NF- κ B et favoriser leur interaction avec l'ADN, il est très probable que Tax ait un effet direct dans le noyau (Petropoulos et al., 1996; Suzuki et al., 1994). Cependant, dans ce cas, cette activité de Tax n'est pas associée à sa SUMOylation ni localisée dans les corps nucléaires. La fusion à l'ubiquitine pourrait bloquer l'interaction de Tax avec les dimères NF- κ B et cet effet de Tax dans le noyau. Ceci expliquerait à la fois l'impossibilité du mutant Tax-K4-8R-Ub d'activer la transcription à partir des promoteurs à éléments de réponse κ B mais également la diminution de la

transactivation de ces mêmes promoteurs par la protéine Tax sauvage lorsqu'elle est fusionnée à l'ubiquitine (Nasr et al., 2006; Peloponese et al., 2004).

3. QUELLES CHAINES D'UBIQUITINE SONT ESSENTIELLES A L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

L'ubiquitylation de Tax par des chaînes K63 est associée à sa capacité à activer la voie NF- κ B. Ce type de chaînes semble en effet être majoritairement conjugué à Tax. Cependant cette observation résulte en fait de purification de protéine Tax-His sur résine de nickel en présence de HA-ubiquitine sauvage ou mutée sur tous les résidus sauf la lysine 48 (HA-UbK48) ou la lysine 63 (HA-UbK63) (Kfoury et al., 2008; Shembade et al., 2007). La conjugaison d'autres chaînes d'ubiquitine, dont les fonctions physiologiques sont encore mal comprises mais sont de plus en plus étudiées, n'a pas été examinée (pour revue (Komander and Rape, 2012; Trempe, 2011)).

Or même si le mutant Tax-P79AQ81A est capable d'activer la voie NF- κ B efficacement, notamment grâce à sa conjugaison aux chaînes K63, cette conjugaison n'est en fait que de 90% par rapport à Tax sauvage. Pourtant, lorsque nous examinons l'ubiquitylation totale du mutant, elle est toujours légèrement supérieure à celle de Tax (**Figure 66**). Il est donc possible que d'autres chaînes d'ubiquitine puissent être conjuguées à Tax. Il est peu probable que les chaînes liées en K48, qui envoient Tax à la dégradation, puissent être détectées de façon significative sans inhibiteurs du protéasome. Il serait donc intéressant d'analyser la conjugaison de Tax-P79AQ81A mais également de Tax sauvage à d'autres types de chaînes d'ubiquitine. Les chaînes liées par la lysine K11 sont particulièrement intéressantes puisqu'elles ont déjà été impliquées dans la voie NF- κ B. En effet, des chaînes K11 ont été détectées sur la protéine RIP1 et il a été montré que NEMO interagissait avec ces chaînes aussi. Ces observations ont conduit à la conception de modèles dans lesquels les chaînes d'ubiquitine K63 et K11 sur la protéine RIP1 coopèrent pour recruter plusieurs complexe IKK et favoriser leur transactivation (Iwai, 2012). Un tel modèle pourrait être étendu à la protéine Tax dont l'ubiquitylation est nécessaire pour recruter le complexe IKK dans les agrégats périnucléaires. Dans la même optique, l'analyse de la conjugaison de Tax à des chaînes d'ubiquitine linéaires serait également pertinente puisque ces chaînes ont aujourd'hui une grande place dans l'activation de la voie NF- κ B et que NEMO se lie à ces chaînes encore plus efficacement qu'aux autres chaînes d'ubiquitine (Iwai, 2012; Kensche et

al., 2012; Schmukle and Walczak, 2012). Cependant une étude récente a montré que l'ajout d'ubiquitine dont toutes les lysines sont mutées (Ub-K0) et qui ne peut donc former que des chaînes d'ubiquitine linéaires, inhibe l'activation du complexe IKK par Tax. Ceci suggère que, si la conjugaison de Tax à des chaînes d'ubiquitine linéaires existe, celle-ci n'est pas suffisante pour l'activation du complexe IKK par Tax (Shibata et al., 2011).

Alors que le profil d'ubiquitylation de Tax a jusqu'à présent été analysé essentiellement de façon générale, il pourrait être intéressant d'examiner plus précisément, non seulement la nature des différentes chaînes d'ubiquitine qui sont conjuguées à Tax mais aussi leur longueur. En effet, une étude a récemment mis en évidence que différentes longueurs de chaînes d'ubiquitine pouvaient induire des propriétés différentes pour une même protéine. Ainsi, les protéines de CMH-II conjuguées à 4 ou 6 ubiquitines sont entraînées vers les lysosomes alors que leur conjugaison à moins de 2 ubiquitines leur permet de rester à la surface cellulaire (Ma et al., 2012).

4. L'UBIQUITINYLATION DE TAX : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE

Nos résultats qui recentrent le modèle de l'activation de la voie NF- κ B par Tax sur son ubiquitylation comme étape cruciale sont importants pour les stratégies thérapeutiques envisagées contre les maladies induites par le virus HTLV-1 et notamment l'ATLL. Plusieurs molécules sont aujourd'hui à l'étude dont certaines ciblent la voie NF- κ B. L'inhibition de la voie NF- κ B induit l'apoptose des cellules ATLL et se révèle donc efficace (pour revue (Taylor and Nicot, 2008)). Cependant, que ce soit le bortezomib, un inhibiteur du protéasome, ou la molécule Bay 11-7082, inhibiteur de la phosphorylation de I κ B, ces molécules restent des inhibiteurs généraux de la voie NF- κ B et peuvent donc avoir des effets toxiques par leur action sur les cellules saines. Cibler spécifiquement l'ubiquitylation de Tax pour bloquer l'activation de la voie NF- κ B pourrait donc s'avérer une stratégie intéressante. Cette stratégie est d'ailleurs à l'étude pour le traitement des cancers. En effet, plusieurs inhibiteurs spécifiques d'enzymes de la machinerie d'ubiquitylation E1, E2 et E3 ont déjà été développés (pour revue (Mattern et al., 2012)). Même si l'enzyme Ubc13 n'ubiquityle pas que Tax, cibler cette enzyme aurait probablement moins de répercussions que l'inhibition du protéasome, les processus de dégradation des protéines par le protéasome étant essentiels au bon fonctionnement cellulaire et pas que dans les cellules ATLL.

D. QUELS ROLES POUR LA SUMOYLATION DE TAX ?

1. LA SUMOYLATION DE TAX N'EST PAS NECESSAIRE A L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

Nos résultats obtenus avec le mutant Tax-P79AQ81A nous ont amené à remettre en question le rôle de la SUMOylation de Tax que nous avons préalablement proposé. Malgré son défaut très sévère de SUMOylation, Tax-P79AQ81A est toujours capable d'activer la voie NF- κ B d'un bout à l'autre en particulier dans des lymphocytes T CD4⁺ primaires. Bien sûr, il peut être objecté que 20% de SUMOylation de la protéine Tax pourrait suffire pour que Tax puisse réaliser ses fonctions. Cependant, ce défaut de SUMOylation est suffisant pour annihiler complètement la formation des corps nucléaires puisque seulement 8% des cellules exprimant Tax-P79AQ81A présentent deux ou trois petits corps nucléaires, dans lesquels RelA n'est pas recruté (**Figure 81**).

De plus, grâce à une régression linéaire, nous avons démontré que l'activation de la voie NF- κ B dépendait essentiellement de l'ubiquitinylation de Tax même si la corrélation entre la transactivation des promoteurs dépendants de NF- κ B et la SUMOylation de Tax n'est pas nulle. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure un rôle de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B mais celui-ci ne serait alors pas indispensable. Cela est particulièrement vrai dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires, cellules cibles du virus HTLV-1 et dans lesquelles l'activation de la transcription dépendante de NF- κ B par Tax-P79AQ81A est assurément aussi efficace que par Tax sauvage (**Figure 74**).

Toutes les études précédentes avaient été réalisées avec des gènes rapporteurs luciférase présents sur des plasmides transfectés dans les cellules (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Il pourrait cependant être intéressant de vérifier que notre mutant est également capable d'activer aussi efficacement que Tax sauvage un promoteur intégré dans le génome cellulaire. Pour cela, nous pourrions utiliser des lignées cellulaires contenant un gène rapporteur intégré ou directement analyser par RT-PCR quantitative la transcription de gènes cellulaires dont l'expression dépend de NF- κ B, comme le gène codant la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) (Ballard et al., 1988). Un rôle de la SUMOylation de Tax pourrait en effet être de recruter des enzymes de modification de la chromatine, telles que des histones acétyltransférases, pour ouvrir la chromatine et permettre le recrutement de la machinerie de transcription sur les promoteurs à éléments de réponse κ B. Cependant, il est peu

probable que Tax recrute de telles enzymes spécifiquement sur les promoteurs à éléments de réponse κ B mais plutôt de façon commune pour l'ensemble des promoteurs que Tax transactive, notamment les promoteurs dépendants de CRE. Cependant, la SUMOylation de Tax ne s'est jamais révélée nécessaire pour l'activation des promoteurs dépendants de CREB (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). De plus, la SUMOylation de nombreux régulateurs de la transcription est le plus souvent associée à une répression de l'expression génique (Gill, 2005; Girdwood et al., 2004).

Cependant, si cette SUMOylation de Tax n'est pas essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B, elle peut être cruciale pour d'autres fonctions de Tax.

2. D'AUTRES ROLES DE LA SUMOYLATION EN DEHORS DE LA VOIE NF- κ B

La première question à se poser dans l'exploration des fonctions de la SUMOylation de Tax est son importance pour les propriétés oncogéniques de Tax. Des tests d'immortalisation de lymphocytes T par Tax et Tax-P79AQ81A pourraient être menés en parallèles pour le déterminer. Cependant, l'activation de la voie NF- κ B étant essentielle dans ce processus d'immortalisation, il est très probable que Tax et Tax-P79AQ81A aient la même capacité à immortaliser les cellules (Robek and Ratner, 1999). Par contre, nous aimerions introduire les mutations de Tax-P79AQ81A dans un provirus HTLV-1 et étudier la capacité de ce provirus à transformer les cellules T. Dans le contexte proviral, la SUMOylation pourrait être nécessaire pour réguler les relations entre Tax et les autres protéines virales.

De façon générale, le mutant Tax-P79AQ81A est un outil très intéressant pour identifier spécifiquement les fonctions de la SUMOylation de Tax. Comme la protéine Tax2 n'est pas SUMOylée, l'identification de telles fonctions pourrait nous permettre de mettre en lumière des fonctions importantes pour la pathogenèse de HTLV-1.

E. LES AUTRES MODIFICATIONS DU MUTANT TAX-P79AQ81A

Pour que la caractérisation du mutant Tax-P79AQ81A soit complète, il nous faudrait analyser les autres modifications post-traductionnelles de Tax : la phosphorylation et l'acétylation. La phosphorylation de Tax, notamment sur les sérines 300/301, étant essentielle à l'activation de la voie NF- κ B, il est probable que Tax-P79AQ81A soit phosphorylé correctement sur ces résidus (Bex et al., 1999). Mais de nombreux autres résidus

phosphorylés ont été identifiés avec des fonctions plus ou moins établies (Bidoia et al., 2010; Durkin et al., 2006). Il serait donc intéressant de les examiner.

Au contraire, l'acétylation de Tax ayant été localisée dans les corps nucléaires, il est vraisemblable que Tax-P79AQ81A ne soit pas acétylé puisque ce mutant ne forme pas de corps nucléaires (Lodewick et al., 2011; Lodewick et al., 2009). Le rôle de l'acétylation de Tax dans la transactivation des promoteurs dépendants de NF- κ B n'a été démontré que sur des promoteurs intégrés dans le génome cellulaire. Il est donc logique que le défaut probable d'acétylation de notre mutant n'affecte pas sa capacité à transactiver les promoteurs à éléments de réponse κ B puisque nos expériences ont été réalisées à partir de gènes rapporteurs sur des plasmides.

II. LES CORPS NUCLEAIRES : FICTION OU REALITE ?

Outre le rôle de la SUMOylation dans l'activation de la voie NF- κ B, nos résultats ont également remis en cause la fonction des corps nucléaires.

A. LES ACIDES AMINES P79 ET Q81 APPARTIENNENT AU TSLS

Le mutant Tax-P79AQ81A, bien que présent dans le noyau, est incapable de former des corps nucléaires dans la très grande majorité des cellules où il s'exprime, qu'il s'agisse de cellules adhérentes ou de lignées lymphocytaires T (**Figure 69**). De façon très intéressante, les acides aminés mutés (P79 et Q81) sont localisés juste après la fin du signal de localisation dans les corps nucléaires (TSLS) qui a été défini entre les acides aminés 50 et 75 (Fryrear et al., 2009) (**Figure 62**). Cette séquence fusionnée à la GFP est en effet capable d'induire la formation de corps nucléaires. Cependant, la délétion de cette séquence seule de la protéine Tax n'a pas été testée. Seul le phénotype d'une protéine Tax délétée des acides aminés 53 à 99, incluant donc P79 et Q81 a été décrit. Il est possible que le TSLS minimal défini entre les acides aminés 50 et 75 soit suffisant pour induire la localisation de la GFP dans les corps nucléaires mais pas pour induire la localisation d'une protéine Tax complète, avec ses modifications post-traductionnelles dans sa partie N-terminale et ses nombreux partenaires qui peuvent affecter sa localisation. La preuve en est, le mutant Tax-P79AQ81A qui contient pourtant un TSLS minimal intact, est effectivement présent dans le noyau mais sans pouvoir

former de corps nucléaires. Nous proposons donc que le TSLS soit étendu aux acides aminés P79 et Q81 dont l'intégrité est essentielle pour la localisation de Tax dans les corps nucléaires.

Alors que la SUMOylation de Tax a toujours été associée à la formation des corps nucléaires, Fryrear *et al.* n'ont pas analysé le profil de SUMOylation des protéines Tax délétées du TSLS mais ont supposé que le TSLS et la SUMOylation étaient deux signaux séparés avec un rôle indirect de la SUMOylation de Tax sur la formation des corps nucléaires (Fryrear *et al.*, 2009). Cependant, notre mutant remet cette hypothèse en cause et permet d'établir un lien entre le TSLS et la SUMOylation de Tax puisque la mutation de P79 et Q81 est associée à un défaut de SUMOylation.

B. CORPS NUCLEAIRES ET SUMOYLATION : UNE ASSOCIATION CONFIRMEE

Nos résultats confirment le lien déjà décrit entre SUMOylation de Tax et corps nucléaires. Le mutant Tax-P79AQ81A présente en effet deux défauts sévères simultanés : la SUMOylation et la formation des corps nucléaires. Il est très peu probable que la mutation de deux acides aminés induise deux défauts avec des origines complètement séparées. Ce lien étroit entre SUMOylation de Tax et corps nucléaires repose notamment sur le fait que les protéines Tax et SUMO1 ou SUMO3 colocalisent essentiellement dans les corps nucléaires (Kfoury *et al.*, 2011; Lamsoul *et al.*, 2005; Nasr *et al.*, 2006). Cependant, il est plus difficile d'établir le lien de cause à effet qui existe entre ces deux processus même si plus d'éléments semblent montrer que la SUMOylation de Tax est nécessaire à la formation des corps nucléaires plutôt que le contraire.

Le rôle de la SUMOylation de Tax dans la formation des corps nucléaires a été défini sur plusieurs critères. D'abord, la mutation des lysines cibles de la SUMOylation abolit en plus de la SUMOylation de Tax, la formation des corps nucléaires. De plus, la fusion d'un mutant non SUMOylé et incapable de former des corps nucléaires à SUMO1, Tax-K6-8R-SUMO1 ou Tax-R4-6K-SUMO1, permet la restauration partielle de la formation de petits corps nucléaires sans recrutement efficace de RelA dans ces corps, comme ce que nous avons observés avec la protéine Tax-P79AQ81A-SUMO1 (**Figure 81**) (Kfoury *et al.*, 2011; Lamsoul *et al.*, 2005; Nasr *et al.*, 2006). Enfin, la fusion de SUMO1 à la protéine Tax sauvage

ou la surexpression de SUMO1 favorise la formation des corps nucléaires dans un nombre de cellules plus important que Tax seul (Lamsoul et al., 2005; Nasr et al., 2006). Cependant, il a été montré récemment que la fusion des mutants Tax-K4-8R ou Tax-K6-8R à l'ubiquitine semblait plus efficace que la fusion à SUMO1 pour restaurer la formation de corps nucléaires (Kfoury et al., 2011).

Il n'est pas possible d'exclure la relation inverse où les corps nucléaires seraient nécessaires pour la SUMOylation de Tax. En effet, la machinerie de SUMOylation, en particulier l'enzyme de conjugaison à SUMO Ubc9, et les protéines SUMO elles-mêmes sont présentes dans ces corps nucléaires (Kfoury et al., 2011). De plus, il est plus facile d'expliquer l'effet des mutations de Tax-P79AQ81A par une altération de la formation des corps nucléaires qui dans un deuxième temps affecterait la SUMOylation de Tax plutôt que l'inverse. En effet, ces mutations touchent très probablement le TSLS alors qu'elles sont très éloignées, dans la séquence, des lysines ciblées par les enzymes de SUMOylation.

Les deux processus s'entretiennent peut-être mutuellement. La SUMOylation de Tax pourrait favoriser le recrutement et l'agrégation des protéines qui composent les corps nucléaires, dont la machinerie de SUMOylation. En retour, les corps nucléaires pourraient être un site de SUMOylation, de NEMO comme cela a été suggéré, ou de Tax (Kfoury et al., 2011).

C. QUELLES FONCTIONS POUR LES CORPS NUCLEAIRES TAX ?

1. LES CORPS NUCLEAIRES TAX NE SONT PAS NECESSAIRES POUR L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

Notre travail a mis en évidence qu'aussi bien le mutant Tax-P79AQ81A que la protéine Tax2 ne formaient de corps nucléaires que dans une très petite minorité de cellules (**Figure 69** et **Figure 86**). Il serait d'ailleurs nécessaire de mieux caractériser ces agrégats nucléaires, très petits dans le premier cas et mal définis dans le deuxième. Notamment, la présence de facteurs d'épissage tels que SC-35, présents dans les corps nucléaires Tax, doit être recherchée dans ces structures nucléaires.

Avant notre étude, d'autres résultats suggéraient déjà que les corps nucléaires n'étaient pas nécessaires à la transactivation des promoteurs à éléments de réponse κ B. En effet, lors de la première mise en évidence des corps nucléaires en microscopie à

fluorescence, il a été observé que des mutants de Tax activant spécifiquement la transcription dépendante de NF- κ B ne forment pas de corps nucléaires, alors que des mutants activant la transcription dépendante de CREB en forment (Semmes and Jeang, 1996). Une autre étude a confirmé cette observation : la fusion de Tax à Rev (protéine du VIH-1) empêche la localisation de Tax dans les corps nucléaires sans affecter l'activité NF- κ B de Tax. Ainsi cette étude a conclu, tout comme nous, que l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B était indépendante des corps nucléaires (Burton et al., 2000).

2. DE NOMBREUSES FONCTIONS POSSIBLES POUR LES CORPS NUCLEAIRES TAX

Si les corps nucléaires n'ont pas de rôle dans l'activation de la voie NF- κ B, ils pourraient être importants pour d'autres fonctions de Tax. Au vu des nombreux composants identifiés dans ces corps nucléaires Tax, les fonctions pourraient être multiples (pour revue (Lodewick et al., 2011)). De façon schématique, 3 grandes fonctions peuvent être attribuées aux corps nucléaires qui peuvent bien sûr être combinées au sein des mêmes structures (Mao et al., 2011).

Premièrement, les corps nucléaires peuvent faciliter le déroulement de certains processus cellulaires en concentrant dans un espace limité tous les composants nécessaires à la réalisation du processus, augmentant la spécificité et l'efficacité des réactions. Dans le cas des corps nucléaires Tax, ces-derniers pourraient ainsi être des sites actifs de SUMOylation puisque l'enzyme Ubc9, les protéines SUMO1 et SUMO3, ainsi que des substrats éventuels, tels que NEMO, sont présents au sein de ces structures (Kfoury et al., 2011).

Deuxièmement, les corps nucléaires en délimitant des compartiments au microenvironnement unique peuvent servir de plate-forme pour la régulation de loci du génome recruté à la périphérie des corps nucléaires. Les corps nucléaires Tax ont en effet été décrits comme des structures de transcription active puisqu'ils contiennent la machinerie de transcription (ARN polymérase, facteur de transcription...) et des ARN néosynthétisés (Baydoun et al., 2007; Bex et al., 1997; Bex et al., 1998; Lodewick et al., 2011; Semmes and Jeang, 1996). Même si nous avons montré que les corps nucléaires Tax ne sont pas nécessaires pour la transcription à partir des promoteurs dépendants de NF- κ B, Tax

transactive de nombreux autres promoteurs, en particulier, les promoteurs à éléments de réponse CRE. Il a également été montré que les origines de réplifications de l'ADN étaient très souvent présentes à la périphérie des corps nucléaires (Boxus et al., 2012). De plus, le complexe hélicase MCM2-7 impliqué dans le processus de réplication est présent dans les corps nucléaires. Les corps nucléaires Tax pourraient donc avoir une fonction dans la régulation de la réplication, en particulier de l'étape d'initiation de la réplication à partir des origines de réplication.

Troisièmement, les corps nucléaires peuvent servir de sites de stockage. Dans le cas des corps nucléaires Tax, il a en effet été question d'une séquestration de la machinerie de réparation dans les corps nucléaires pour empêcher son recrutement au niveau des cassures de l'ADN (Belgnaoui et al., 2010).

Comme pour la plupart des corps nucléaires, les corps nucléaires Tax ne semblent pas localisés au hasard dans le noyau. La proximité des origines de réplication ou des corps PML le montre (Bex et al., 1997; Boxus et al., 2012). La compréhension des mécanismes qui régulent la localisation mais également la taille ou le nombre de corps nucléaires pourrait nous permettre de mieux appréhender leurs fonctions. Notamment, une question est essentielle : vérifier que les corps nucléaires se construisent bien autour de la protéine Tax. Pour cela, il est possible d'immobiliser Tax sur la chromatine par le biais d'un système LacI/LacO comme cela a déjà été utilisé pour étudier la formation des corps de Cajal (Kaiser et al., 2008). En intégrant la séquence opérateur de l'opéron lactose, LacO, dans le génome cellulaire, la protéine Tax fusionnée à l'inhibiteur de l'opéron lactose, LacI, va venir se fixer sur cette séquence LacO. Ainsi nous pourrions étudier la formation des corps nucléaires autour de la protéine Tax, analyser l'importance du site d'intégration de LacO et donc des séquences environnantes pour la formation et les fonctions des corps nucléaires Tax. En utilisant des mutants de Tax, nous pourrions également vérifier si la SUMOylation de Tax est bien essentielle au recrutement des nombreux composants des corps nucléaires Tax.

Cependant, avant d'étudier de façon approfondie les fonctions des corps nucléaires Tax, il est primordial de déterminer si les corps nucléaires existent réellement dans les cellules infectées par le virus HTLV-1.

D. LES CORPS NUCLEAIRES : ESSENTIELLEMENT OBSERVES DANS CELLULES TRANSFECTEES

Nous avons observé que des corps nucléaires Tax étaient très rarement présents dans des lignées de cellules T chroniquement infectées par le virus HTLV-1. Dans ce cas, les corps nucléaires, qui ont été quasiment exclusivement étudiés dans des cellules transfectées et plus particulièrement dans les cellules adhérentes pour des raisons de facilité d'observation en microscopie, ne seraient alors pas nécessaires non seulement pour l'activation de la voie NF- κ B mais d'une façon générale pour l'ensemble des fonctionnalités de Tax. Le fait que nous observions très rarement des corps nucléaires dans les cellules C8166 ou HUT-102 ne vient pas du fait de la difficulté de réaliser des immunofluorescences sur des cellules T en suspension puisque les corps nucléaires sont très nettement visibles dans des cellules T CEM ou Jurkat transfectées par un plasmide codant la protéine Tax (**Figure 69C** et résultats non montrés).

Pourtant, quelques rares études ont décrit des corps nucléaires dans des cellules chroniquement infectées par HTLV-1. Dans l'étude de Semmes *et al.*, le marquage en immunofluorescence de la protéine Tax dans des cellules C8166 et MT2 (cellules transformées par HTLV-1) (Semmes and Jeang, 1996) est effectivement hétérogène et granuleux dans le noyau mais ne permet pas d'identifier des corps nucléaires aux contours bien définis comme ceux que l'on peut observer dans les cellules transfectées. De plus, d'autres composants de ces corps nucléaires, comme SC-35 par exemple, n'ont pas été analysés en parallèle dans ces cellules. Bex *et al.* ont également réalisé des observations sur des cellules transformées par HTLV-1, MT2 et SLB (Bex et al., 1997; Bex et al., 1998). Dans les cellules MT2, le marquage Tax fait effectivement apparaître des petits spots nucléaires alors que ces derniers sont beaucoup plus difficiles à identifier dans la majorité des cellules SLB de l'image montrée. Dans ces cellules, la caractérisation des corps nucléaires a été un peu plus poussée puisque la localisation du facteur d'épissage Sm, de l'ARN polymérase et de CDK8 a été analysée (Bex et al., 1997). Cependant, la colocalisation de Tax et ces différents facteurs dans des corps nucléaires bien définis n'est pas évidente. Par contre la colocalisation entre Tax et CBP, p300 et ATF1 dans des petits spots nucléaires est assez nettement visible (Bex et al., 1998).

Le marquage Tax dans le noyau des cellules transformées par HTLV-1 est effectivement hétérogène et granuleux mais ne ressemble pas à ce que nous pouvons observer dans des cellules transfectées exprimant la protéine Tax. Cette observation se retrouve dans la plupart des études ayant montré des immunofluorescences sur des cellules transformées par HTLV-1 (Andresen et al., 2011; Ching et al., 2006; Gatza and Marriott, 2006; Yamamoto et al., 2011). Pourtant d'autres types de corps nucléaires comme les corps PML sont nettement détectés dans ce même type de cellules (Ariumi et al., 2003). Baydoun *et al.* ont mis en évidence la présence de corps nucléaires Tax contenant l'ARN polymérase dans des cellules C8166. Les corps nucléaires sont ici bien nets mais présents uniquement dans l'une des deux cellules présentées (Baydoun et al., 2007). Des images de C8166 avec des corps nucléaires ont également été montrées dans d'autres études mais soit avec une seule cellule à chaque fois soit ces corps nucléaires ne sont pas présents dans toutes les cellules (Fryrear et al., 2012; Gatza and Marriott, 2006; Harhaj et al., 2007). D'autres études enfin ont montré des images de C8166 sans aucun corps nucléaires mais seulement un marquage granuleux dans le noyau (Kfoury et al., 2008; Meertens et al., 2004). Dans toutes ces études, il manque donc des données quantitatives pour estimer la proportion de cellules présentant un phénotype avec des « corps nucléaires » comme ce que nous avons réalisé dans notre étude et qui est le plus souvent fait pour les cellules transfectées, puisque jamais 100% des cellules exprimant Tax après transfection ne présentent des corps nucléaires dans leurs noyaux.

Dans toutes les images que nous avons pu obtenir dans nos expériences d'immunofluorescence et dans la littérature, la présence de corps nucléaires dans une majorité des cellules infectées par le virus HTLV-1 n'est pas évidente et même si tel est le cas, ces corps nucléaires sont loin de ressembler à ceux que nous pouvons observer dans les cellules transfectées, en particulier les cellules adhérentes les plus utilisées pour les études des fonctions des corps nucléaires. Il est donc difficile d'étendre le rôle des corps nucléaires identifié dans des cellules transfectées à des cellules infectées par HTLV-1. D'ailleurs aucune expérience n'a encore mis en évidence la présence de corps nucléaires Tax dans des cellules T fraîchement infectées par le virus HTLV-1.

La différence que l'on peut observer entre les cellules infectées par HTLV-1 et les cellules transfectées peut venir de la présence des autres protéines virales dans les premières qui pourraient influencer la localisation subcellulaire de Tax. D'autre part, les niveaux d'expression de Tax dans ces différents types cellulaires peuvent être différents. Or

un effet différentiel de Tax a déjà été mis en évidence en fonction de la dose de Tax dans les cellules (Schavinsky-Khrapunsky et al., 2008). Différentes concentrations de Tax dans les cellules pourraient donc induire ou non la formation de corps nucléaires bien qu'une étude ait montré que la capacité de différents mutants de Tax à former ou non des corps nucléaires n'était pas corrélée à leur niveau d'expression dans les cellules (Semmes and Jeang, 1996).

Il est donc nécessaire de déterminer avec précision si les corps nucléaires existent réellement dans les cellules infectées par HTLV-1 et si tel est le cas, de mieux les caractériser pour établir dans quelle mesure il est possible de les assimiler aux corps nucléaires observés dans les cellules transfectées.

III. TAX2, UNE PROTEINE INDEPENDANTE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Notre étude s'est également portée sur la protéine Tax2 du virus HTLV-2. Nous avons en effet pour objectif de déterminer si les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B canonique par les deux protéines étaient identiques. En collaboration avec l'équipe du Pr. Renaud MAHIEUX à l'ENS Lyon, nous avons caractérisé la localisation subcellulaire de Tax2 et ses modifications post-traductionnelles qui avaient été beaucoup moins étudiées que celles de Tax1.

A. TAX2 ET TAX1, DEUX LOCALISATIONS SUBCELLULAIRES DIFFERENTES

Nos expériences d'immunofluorescence nous ont d'abord confirmé la localisation essentiellement cytoplasmique de Tax2, déjà décrite à plusieurs reprises (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004; Sheehy et al., 2006; Turci et al., 2009; Turci et al., 2006). Par contre, nous n'avons pas observé de corps nucléaires semblables à Tax1 formés par Tax2, contrairement à ce qu'ont observé Turci *et al.* (Turci et al., 2009) (**Figure 86**). Ces corps nucléaires n'avaient d'ailleurs pas été observés dans les différentes expériences d'immunofluorescence menées avant l'étude de Turci *et al.* (Chevalier et al., 2005; Meertens et al., 2004; Turci et al., 2006). Seule une étude avait montré une hétérogénéité du marquage dans le noyau avec un aspect granuleux (Sheehy et al., 2006). Cette hétérogénéité

du marquage Tax2 dans le noyau avec des tâches plus intenses qui suggèrent la présence d'agrégats de Tax2, nous l'avons également observé dans environ 20% des cellules. Cependant, ces agrégats de Tax2 ont des limites mal définies et peuvent être de tailles très variables, contrairement aux corps nucléaires Tax1 qui sont bien distincts et uniformes dans le noyau (**Figure 86**). L'observation de ces agrégats de Tax2 dans le noyau de seulement 20% des cellules suggère que, comme pour les corps nucléaires Tax1, leur fonction ne doit pas être essentielle pour les interactions de Tax2 avec les processus cellulaires et notamment la voie NF- κ B.

B. TAX2 ACTIVE LA VOIE NF- κ B CANONIQUE

Il avait déjà été établi par 3 études que Tax2 activait la voie NF- κ B canonique mais la comparaison du niveau d'activation par rapport à celui induit par la protéine Tax1 donnait soit une activation un peu plus faible, soit équivalente, soit significativement plus forte (Huang et al., 2009; Meertens et al., 2004; Turci et al., 2009). Comme Huang *et al.*, nous avons montré que Tax2 activait un promoteur à éléments de réponse κ B de manière équivalente à Tax1 dans les cellules HeLa (**Figure 88**). De façon cohérente, Tax2 interagit efficacement avec NEMO, la sous-unité régulatrice du complexe IKK (**Figure 87A**). Par contre, les sous-unités catalytiques IKK α et β phosphorylées co-immunoprécipitent à un niveau moindre avec Tax2 qu'avec Tax1. Huang *et al.* avaient précédemment montré que Tax2 pouvait interagir avec NEMO mais pas avec IKK α et β dans des expériences de GST-pulldown (Huang et al., 2009). Alors que nous avons révélé dans nos co-immunoprécipitations les protéines IKK endogènes, il est possible que la fusion GST des protéines IKK utilisées dans les expériences de Huang *et al.* gêne l'interaction déjà faible avec Tax2 alors que l'interaction plus forte avec Tax1 est bien visible.

A part une différence de force d'interaction avec les sous-unités catalytiques du complexe IKK, une autre différence dans les mécanismes d'activation du complexe IKK par Tax1 et Tax2 a été mise en évidence : Tax2, contrairement à Tax1, ne relocalise pas le complexe IKK dans les radeaux lipidiques de l'appareil de Golgi (Huang et al., 2009). Pourtant, nous avons mis en évidence que Tax2 induisait la relocalisation de NEMO dans des agrégats périnucléaires (**Figure 87B**). Cependant, les agrégats périnucléaires de Tax2 ne colocalisent pas avec GM-130, un marqueur de l'appareil de Golgi, dans les expériences

d'immunofluorescence que nous avons réalisées, contrairement aux agrégats périnucléaires de Tax1 (Article 2, Annexes). Ainsi, ces observations suggèrent que l'activation de la voie NF- κ B par Tax1 et par Tax2 suit des mécanismes moléculaires différents. La compréhension du mécanisme d'activation par Tax2 passe entre autres par la caractérisation des agrégats périnucléaires formés par Tax2 et l'identification des partenaires recrutés dans ces agrégats.

L'utilisation de deux mécanismes différents par Tax1 et Tax2 pour activer la voie NF- κ B a été confirmée par l'analyse des modifications post-traductionnelles des deux protéines.

C. LA PROTEINE TAX2 N'EST NI UBIQUITINYLEE NI SUMOYLEE

1. LE PIEGE DE LA SUREXPRESSION

La seule étude des modifications post-traductionnelles de Tax2 a conclu à une ubiquitinylation et une SUMOylation de Tax2 équivalentes à celles de Tax1 (Turci et al., 2009). Contrairement, à ces résultats, nous avons montré que la protéine Tax2 n'était ni ubiquitinylée ni SUMOylée ou dans des proportions négligeables comparées à Tax1 (**Figure 85B**). Cette différence radicale de nos conclusions vient certainement des conditions dans lesquelles nous avons analysé les profils de modifications post-traductionnelles. Alors que Turci *et al.* surexprimaient l'ubiquitine et SUMO dans les cellules avant la purification des protéines Tax1 et Tax2, nous avons examiné la conjugaison de Tax2 à l'ubiquitine et SUMO2/3 endogènes. Or la surexpression de protéines de modification peut aboutir à des artéfacts. L'exemple le plus évident est celui de NEDD8 (*neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 8*), une petite protéine proche de l'ubiquitine : la surexpression de NEDD8 dans les cellules permet la conjugaison de NEDD8 à des substrats grâce à la machinerie d'ubiquitinylation. Ainsi des protéines ubiquitinylées ont pu être identifiées comme des substrats de la neddylation par erreur (Hjerpe et al., 2012). Au laboratoire, nous avons vérifié que la surexpression de l'ubiquitine conduisait effectivement à l'ubiquitinylation de Tax2 de façon équivalente à Tax1 (**Figure 85A**). Il faut donc être très prudent avec la surexpression de protéines même si cela rend plus facile la détection des modifications post-traductionnelles parfois très labiles (Hjerpe and Rodriguez, 2008). C'est pourquoi, dans notre étude, nous avons quasi exclusivement analysé l'ubiquitinylation et la SUMOylation endogène des protéines Tax.

Nous avons donc montré pour la première fois que la protéine Tax2 n'est ou très peu ubiquitinylée et SUMOylée. Comme la protéine Tax2 active efficacement la voie NF- κ B, cela suggère que ces modifications post-traductionnelles ne sont pas requises pour cette fonction de Tax2. Ce n'est pas une surprise dans le cas de la SUMOylation puisque cette observation confirme au contraire nos résultats obtenus avec la protéine Tax1. Par contre, le rôle de l'ubiquitinylation de Tax1 est essentiel pour l'activation de NF- κ B et cette observation de la non-ubiquitinylation de Tax2 est donc plus surprenante.

2. UNE ACTIVATION DU COMPLEXE IKK INDEPENDANTE DE L'UBIQUITINE

Pour vérifier qu'un reliquat d'ubiquitinylation de Tax2 n'était pas suffisant pour activer la voie NF- κ B, nous avons réalisé en parallèle avec les expériences avec un mutant de Tax2 dont toutes les lysines ont été mutées (Tax2-K0) et donc ne peut plus être ubiquitinylé. Ce mutant est également capable d'activer la voie NF- κ B confirmant que l'ubiquitinylation de Tax2 n'est pas nécessaire à cette activation. Seule la co-immunoprécipitation des sous-unités phosphorylées IKK α et β , bien que suffisante, paraît moins efficace pour Tax2-K0 que pour Tax2 sauvage (**Figure 87A**). Plutôt que l'absence d'ubiquitinylation résultant de la mutation de toutes les lysines de la protéine, cette différence peut être liée à une altération de la conformation du mutant par rapport à Tax2 sauvage, comme semble le confirmer le fait que Tax2-K0 active moins efficacement que Tax2 le promoteur à éléments de réponse CRE (**Figure 88**).

L'indépendance de l'activation de la voie NF- κ B vis-à-vis de l'ubiquitinylation de Tax2 implique un autre mécanisme d'activation de la voie NF- κ B et en particulier du complexe IKK par rapport à Tax1. En effet, l'ubiquitinylation de Tax1 est essentielle pour l'interaction avec NEMO et donc par la suite la relocalisation du complexe IKK dans les agrégats périnucléaires. Tax2 peut interagir avec NEMO et le recruter également dans des agrégats périnucléaires mais qui sont différents de ceux de Tax1. Nous pouvons proposer deux possibilités pour cette interaction de Tax2 avec NEMO : une interaction directe ou indirecte. L'interaction directe a déjà été montrée entre la région riche en leucines de Tax1 et les régions leucine zipper de NEMO (Xiao et al., 2000). Cette interaction est également nécessaire en plus des chaînes d'ubiquitine pour le recrutement et l'activation du complexe IKK par Tax1. Dans le cas de Tax2, cette interaction directe pourrait être suffisante. L'autre possibilité est le recrutement par Tax2 d'un partenaire spécifique qui porte des chaînes d'ubiquitine et

renforce l'interaction avec NEMO. La recherche d'un tel partenaire peut s'avérer laborieuse mais il pourrait être intéressant de commencer en ciblant des protéines qui ont déjà été identifiées comme des partenaires spécifiques de Tax2. Une étude a justement analysé les interactomes des protéines des virus HTLV-1 et HTLV-2 dont les protéines Tax (Simonis et al., 2012). Sur les 57 protéines identifiées qui interagissent avec Tax1, 34 n'interagissent pas avec Tax2. Inversement, sur les 49 protéines identifiées comme interagissant avec Tax2, 26 n'interagissent pas avec Tax1, ce qui permet de réduire le nombre de candidats. Notamment la protéine NKAP (*NF- κ B-Activating Protein*) activatrice de la voie NF- κ B pourrait être un candidat intéressant.

Les différences apparentes de modifications post-traductionnelles entre Tax1 et Tax2 peuvent être le résultat d'une interaction différente avec des régulateurs de ces modifications, en particulier les enzymes E3 des machineries d'ubiquitylation et de SUMOylation.

IV. LES ENZYMES DE MODIFICATION DE TAX

A. LES UBIQUITINES LIGASES (E3)

Bien que la protéine RNF4 ait déjà été identifiée, nous avons expliqué plus haut qu'il était peu probable que cette ubiquitine ligase soit responsable de l'ubiquitylation de Tax dans des conditions cellulaires normales. Or comme nous l'avons vu précédemment, l'ubiquitylation de Tax est essentielle pour l'activation de la voie NF- κ B et donc pour les propriétés oncogéniques de Tax. L'une des stratégies thérapeutiques qui pourrait donc être envisagée serait de bloquer cette ubiquitylation. Plusieurs molécules sont déjà à l'étude et pour induire le moins d'effets secondaires, il faudrait idéalement inhiber l'enzyme E3 ubiquitine ligase qui est la plus spécifique (Mattern et al., 2012). Dans cette optique, il est important d'identifier la ou les E3 ubiquitine ligase(s) de Tax.

1. LES PROTEINES TRAF, DES CANDIDATES A CONFIRMER

Dans le but d'identifier l'ubiquitine ligase de Tax, nous nous sommes intéressés aux protéines TRAF, une famille d'ubiquitine ligases importantes pour l'activation de la voie NF- κ B.

La protéine TRAF5 semble être une bonne candidate puisqu'elle est un régulateur positif de l'ubiquitinylation de Tax et de façon cohérente de l'activation de la voie NF- κ B par Tax. Nos résultats confirment une observation déjà faite d'une augmentation de l'ubiquitinylation de Tax par TRAF5 dans des conditions de surexpression de HA-Ubiquitine (Yu et al., 2008). Cependant, pour confirmer ces résultats, il faudrait démontrer que TRAF5 est nécessaire à l'ubiquitinylation de Tax par l'enzyme de conjugaison E2 Ubc13. Alors que les protéines TRAF2 et TRAF6 sont connues pour fonctionner avec l'enzyme Ubc13 et conjuguer des chaînes d'ubiquitine K63 sur les protéines substrats, cela n'a pas été montré pour TRAF5 (Habelhah et al., 2004; Lamothe et al., 2007). Nous aimerions donc pouvoir montrer que Tax, TRAF5 et Ubc13 forment un complexe et que la diminution de l'expression de TRAF5 par ARN interférence bloque les effets de la surexpression de Ubc13 sur l'ubiquitinylation de Tax (Shembade et al., 2007).

Pour pouvoir conclure que TRAF5 est l'ubiquitine ligase de Tax, il faudrait également mieux comprendre l'effet de TRAF5 sur la voie NF- κ B. En effet, à ce jour, il n'est pas évident que l'effet observé d'augmentation de l'activation de la voie NF- κ B par Tax soit spécifique de l'augmentation de l'ubiquitinylation de Tax, puisque TRAF2, qui a l'effet inverse sur l'ubiquitinylation de Tax augmente également l'activation de la voie NF- κ B. Il est possible d'expliquer cet effet contradictoire de TRAF2. En effet, l'étude qui a mis en évidence l'effet positif de TRAF5 sur l'ubiquitinylation de Tax a également mis en évidence un effet positif de TRAF2 sur l'ubiquitinylation mais dans une moindre mesure par rapport à TRAF5 (Yu et al., 2008). Ainsi, dans des conditions où l'ubiquitine est surexprimée, TRAF2 favorise l'ubiquitinylation de Tax alors qu'elle l'inhibe en présence de concentrations endogènes d'ubiquitine dans le même type cellulaire (**Figure 57A**). Comme semble l'indiquer le peu d'effet des siARNTRAF2 (**Figure 57B**), il est donc probable que l'effet inhibiteur de l'ubiquitinylation de TRAF2 sur Tax soit indirect et seulement dû à une ubiquitinylation préférentielle par TRAF2 d'autres substrats que Tax, tels que RIP1, et donc une conjugaison importante d'ubiquitine à d'autres protéines que Tax, consommant l'ubiquitine libre des cellules. Par contre, lorsque l'ubiquitine n'est pas limitante, TRAF2 pourrait favoriser l'ubiquitinylation de Tax (Yu et al., 2008). TRAF2 étant une ubiquitine ligase importante pour l'activation de la voie NF- κ B canonique, certains des substrats ubiquitinylés par TRAF2, tels que RIP1 (Au and Yeh, 2007), lors de la surexpression de TRAF2 favoriseraient donc l'activation de la voie NF- κ B. Bien sûr, la surexpression de TRAF2 seule ne permet pas d'activer la voie

NF- κ B. Cependant, Tax, dont l'ubiquitinylation n'est diminuée que de 50%, peut activer la voie NF- κ B et le signal peut ensuite être amplifié par TRAF2. De plus, en présence de Tax, les mécanismes de régulation négatifs de la voie sont également inhibés, notamment l'action du complexe A20, ce qui pourrait favoriser l'effet activateur de TRAF2 en empêchant la déubiquitinylation des substrats de TRAF2 (Shembade et al., 2008; Shembade et al., 2010).

Bien sûr, il est nécessaire de confirmer ce modèle et de s'attacher en parallèle à déterminer si l'effet de TRAF5 sur l'ubiquitinylation de Tax et sur la voie NF- κ B induite par Tax est direct ou indirect, comme pour TRAF2. C'est seulement à cette condition que nous pourrions affirmer que TRAF5 est une ubiquitine ligase de Tax.

2. LA COMPARAISON TAX1/TAX2 : UN OUTIL PUISSANT POUR IDENTIFIER LES UBIQUITINES LIGASES DE TAX1

Les lysines cibles de l'ubiquitinylation de Tax1, les lysines 4 à 8, sont toutes conservées dans la protéine Tax2. L'absence d'ubiquitinylation de Tax2 n'est donc pas la conséquence d'un problème de lysines potentielles mais plus probablement d'une différence d'interaction avec la machinerie d'ubiquitinylation. Nous avons confirmé cela en montrant que l'enzyme E2 de conjugaison Ubc13 qui, lorsqu'elle est surexprimée augmente l'ubiquitinylation de Tax1 et sa capacité à activer la voie NF- κ B, n'avait pas d'effet sur Tax2 (Article 2, Annexes). La comparaison des séquences protéiques de Tax1 et Tax2 peut donc nous permettre d'identifier des différences qui pourraient être à l'origine d'un recrutement des enzymes d'ubiquitinylation par Tax1 mais pas par Tax2. Pour restreindre notre comparaison de séquence, nous avons réalisé des chimères des protéines Tax1 et Tax2 pour identifier dans un premier temps les régions de Tax1 impliquées dans son ubiquitinylation. Ces protéines chimères nous ont révélé que le remplacement des acides aminés 114 à l'extrémité C-terminale de Tax2 par celle de Tax1 permettait à la protéine d'être ubiquitinylée. Par contre, le remplacement uniquement des acides aminés 221 à l'extrémité C-terminale de Tax2 par celle de Tax1 n'est pas suffisant pour induire l'ubiquitinylation de la protéine. Ainsi, nous avons pu déterminer que la région 114-353 de Tax1, qui contient notamment les lysines cibles, est suffisante pour permettre l'ubiquitinylation de Tax1 et que la région 114-221 semble particulièrement critique pour cette ubiquitinylation (Article 2, Annexes). Des comparaisons de séquence ont permis d'identifier les résidus non conservés entre Tax1 et

Tax2. Parmi eux plusieurs sont des résidus phosphorylables (sérine ou thréonine). Or les ubiquitine ligases peuvent cibler spécifiquement des protéines phosphorylées. Plusieurs exemples sont bien connus, notamment dans la voie NF- κ B : I κ B α ou NEMO lors d'un stress génotoxique (pour revue (Gao and Karin, 2005; Vertegaal, 2011)). Notamment, un motif SLTTGAL (aa 199-205) dans la région critique identifiée est présent chez Tax1 mais pas chez Tax2 et correspond à un motif consensus de phosphorylation par la kinase caséine 1 (CK1). Or il a justement été montré que cette kinase pouvait réguler l'ubiquitylation de substrats par phosphorylation (Inuzuka et al., 2010). Cette protéine est donc un bon premier candidat à tester pour comprendre la régulation de l'ubiquitylation de Tax1 et à terme identifier la ou les ubiquitine(s) ligases impliquées.

3. D'AUTRES OPTIONS : PAS D'E3 OU PLUSIEURS E3

La difficulté d'identifier l'ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitylation de Tax pourrait être expliquée par l'existence de plusieurs ubiquitine ligases avec des fonctions redondantes. Ainsi l'inhibition de l'une n'aurait pas forcément un effet significatif sur l'ubiquitylation de Tax. Les capacités d'interactions multiples de la protéine Tax vont d'ailleurs dans ce sens (Boxus et al., 2008).

Une autre possibilité est que cette ubiquitine ligase n'existe pas. En effet, une étude a montré qu'une protéine possédant un domaine de liaison à l'ubiquitine pouvait interagir directement avec l'enzyme E2 chargée de l'ubiquitine et être ubiquitylée sans intervention d'une E3 ligase comme dans le cas de la SUMOylation (Hoeller et al., 2007). Plus récemment, il a été montré qu'une protéine sans domaine de liaison à l'ubiquitine pouvait également être ubiquitylée sans E3 ligase dans un essai d'ubiquitylation *in vitro* (Kao et al., 2012). Que la protéine Tax contienne ou non un domaine de liaison à l'ubiquitine, il a été montré que Tax interagissait avec l'enzyme E2 Ubc13 par co-immunoprécipitation (Shembade et al., 2007). Cependant, cette technique ne permet pas de déterminer si cette interaction est directe ou nécessite la présence d'une enzyme E3. Pour le savoir, il faudrait réaliser une expérience de GST-pulldown avec des protéines Tax et Ubc13 recombinantes. Un autre moyen de définir si l'enzyme E2 suffit pour ubiquityler Tax serait de réaliser un test d'ubiquitylation de Tax *in vitro* dans lequel nous maîtrisons la composition en enzymes du milieu réactionnel. Même si Tax peut être ubiquitylée sans l'intermédiaire d'une ubiquitine

ligase, il reste possible que certaines ubiquitine ligases soient quand même capables de favoriser son ubiquitinylation comme cela a été montré dans le cadre de la SUMOylation. Cependant, leur absence n'affectera pas forcément l'ubiquitinylation de Tax, rendant difficile les recherches de telles enzymes. Avant de poursuivre la recherche d'une ubiquitine ligase de Tax, il est important d'écarter cette possibilité.

B. LA REGULATION DE LA SUMOYLATION

Alors que la SUMOylation de Tax est bien démontrée dans les cellules transfectées, y compris dans notre étude avec les protéines SUMO2/3 endogènes, la régulation de ce processus est par contre très mal comprise.

Comme notre étude Tax2 nous a donné des clés pour étudier la régulation de l'ubiquitinylation de Tax1, notre étude sur le mutant Tax-P79AQ81A nous donne également la possibilité de mieux comprendre les déterminants de la SUMOylation de Tax. En effet, les acides aminés P79 et Q81 semblent être très importants pour permettre la SUMOylation. Ils pourraient permettre l'identification d'une SUMO ligase de Tax même si l'intervention de ces enzymes dans le processus de SUMOylation ne semble pas toujours nécessaire (Wilkinson and Henley, 2010). Cependant, les enzymes de SUMOylation interagissent généralement à proximité des lysines cibles de la modification, ce qui n'est pas le cas de notre motif PxQxT qui est loin des lysines 7 et 8. Par contre les acides aminés 79 et 81 pourraient recruter d'autres facteurs qui favorisent la SUMOylation de Tax. Ces acides aminés pourraient également favoriser la SUMOylation de Tax de façon indirecte en régulant la localisation de la protéine. Ce scénario est cohérent avec nos résultats qui montrent que le mutant Tax-P79AQ81A présente une altération de sa localisation subcellulaire par rapport à Tax sauvage associée à la déficience en SUMOylation.

Comprendre l'implication des acides aminés P79 et Q81 dans la SUMOylation de Tax pourrait permettre de mieux comprendre la régulation de cette modification de Tax, éventuellement en lien avec la localisation subcellulaire de Tax.

V. CONCLUSION

La protéine Tax1 du virus HTLV-1 est une protéine pléiotropique qui joue un rôle essentiel dans l'établissement de la pathogenèse du virus. L'activation constitutive de la voie NF- κ B par Tax1 favorise notamment la prolifération et l'immortalisation des lymphocytes T CD4⁺ infectés par le virus HTLV-1, pouvant amener à leur transformation et au développement d'une ATLL chez les personnes infectées. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'activation de la voie NF- κ B par Tax1 pour envisager des stratégies thérapeutiques bloquant spécifiquement ce processus. De nombreuses études ont déjà permis d'apporter des éléments de réponse à ce mécanisme et d'établir un premier modèle de cette activation de la voie NF- κ B canonique par Tax1. Notre laboratoire et d'autres équipes ont en effet décrit une activation en deux phases : une phase cytoplasmique d'activation du complexe IKK induite par Tax1 ubiquitinylé par des chaînes K63 dans des agrégats périnucléaires et une phase nucléaire où Tax1 SUMOylé interagit directement avec les dimères NF- κ B sur l'ADN dans les corps nucléaires.

Au cours de ma thèse, nous avons voulu approfondir ce modèle et comprendre comment étaient régulées ces modifications post-traductionnelles. De plus, nous nous sommes demandé si ce modèle pouvait être étendu à l'activation de la voie NF- κ B canonique induite par la protéine Tax2 du virus HTLV-2. Le virus HTLV-2 n'ayant pas les propriétés transformantes du virus HTLV-1, la mise en évidence de différences entre les propriétés de Tax1 et Tax2 pourraient nous permettre d'identifier des déterminants importants pour la transformation des cellules par HTLV-1.

L'identification d'un nouveau mutant de Tax1, Tax-P79AQ81A, ubiquitinylé mais à peine SUMOylé et ne formant pas de corps nucléaires, nous a donné un nouvel outil pour étudier le rôle individuel de la SUMOylation dans l'activation de la voie NF- κ B. Les résultats obtenus avec ce mutant, et confirmés sur d'autres mutants de Tax, nous ont amené à repenser le modèle actuel de l'activation de la voie NF- κ B par Tax1 en le centrant sur l'ubiquitylation qui s'est révélée être la modification essentielle pour l'activation de l'ensemble de la voie (**Figure 89A**). Au contraire, la SUMOylation et les corps nucléaires ne semblent pas être nécessaires à cette activation. De façon similaire, la protéine Tax2 n'est pas SUMOylée et ne forme pas de corps nucléaires tout en activant efficacement la voie NF- κ B canonique. Mais de façon plus surprenante, Tax2 n'est pas non plus ubiquitinylée,

impliquant une activation de la voie NF- κ B selon un mécanisme encore différent du modèle d'activation que nous avons mis en évidence pour Tax1 (**Figure 89B**).

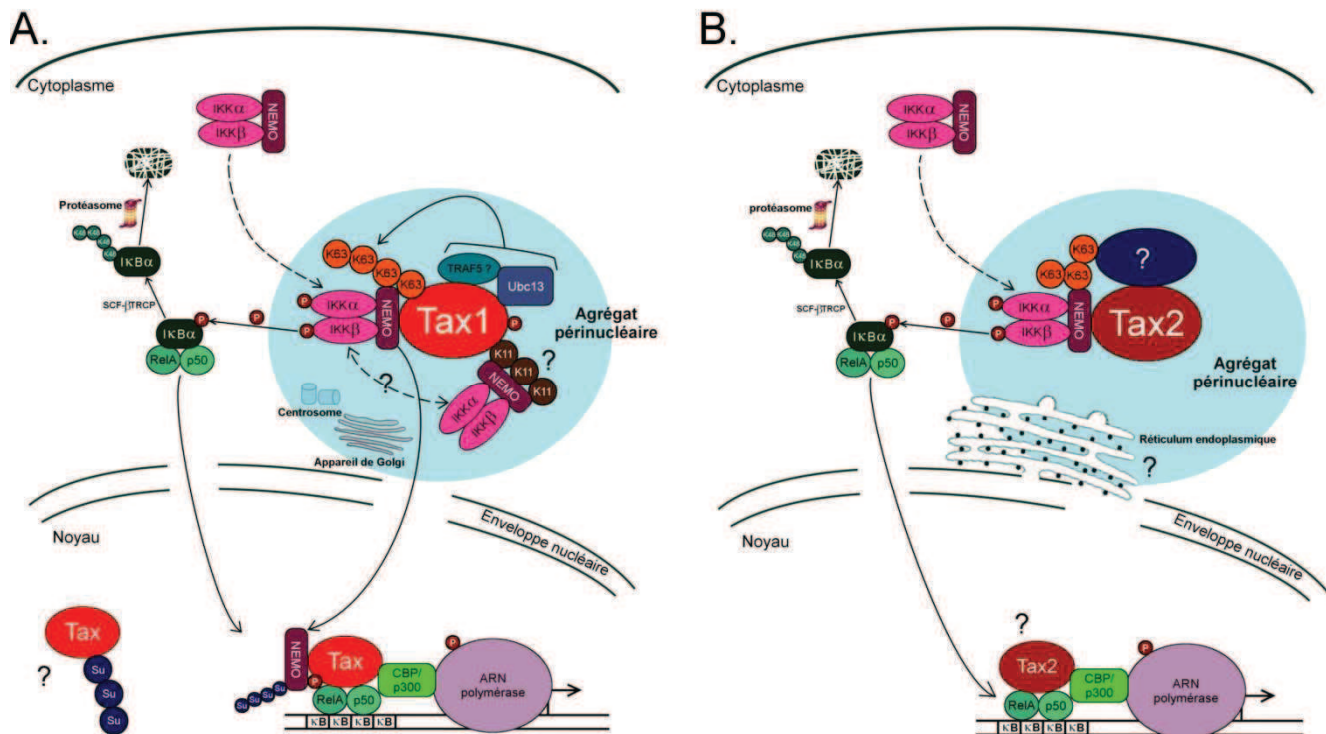


FIGURE 89 : NOUVEAUX MODELES D'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B PAR TAX1 ET TAX2

A. L'essentiel de l'activation de la voie NF- κ B est induit grâce à l'ubiquitinylation de Tax1. Les chaînes d'ubiquitine liées en K63 permettent de recruter le complexe IKK dans des agrégats périnucléaires colocalisant avec le centrosome et l'appareil de Golgi. Ainsi Tax1 induit l'activation constitutive du complexe IKK, la phosphorylation de I κ B α et donc la translocation nucléaire du dimère NF- κ B RelA-p50 qui peut se fixer sur les promoteurs à éléments de réponse κ B. L'ubiquitinylation de Tax1 induit également la translocation de NEMO dans le noyau et sa SUMOylation, ce qui pourrait également être important pour l'activation de la transcription. Tax1 peut interagir avec les dimères NF- κ B au niveau des promoteurs et recruter des co-activateurs de la transcription (CBP/p300) et la machinerie de transcription mais la SUMOylation et la formation de corps nucléaires ne sont pas requis pour cet effet activateur de Tax. Plusieurs questions restent encore non résolues dans ce modèle et sont matérialisées par des points d'interrogation. L'ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitinylation de Tax en partenariat avec l'enzyme E2 Ubc13 est encore inconnue mais la protéine TRAF5 pourrait être une bonne candidate. La conjugaison de Tax1 à d'autres types de chaînes d'ubiquitine que les chaînes K63 et K48 n'a pas encore été examinée. Sur le même modèle que RIP1, des chaînes d'ubiquitine K11 pourrait permettre de recruter d'autres complexes IKK et leur transactivation. La SUMOylation de Tax n'étant pas nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B, il reste à déterminer la fonction de Tax SUMOylé.

B. La protéine Tax2 active la voie NF- κ B sans être ubiquitinylée. L'interaction de Tax2 avec NEMO peut donc être directe comme cela a été montré pour Tax1 et/ou nécessiter les chaînes d'ubiquitine K63 d'un partenaire encore non identifié. Tax2 active ainsi constitutivement le complexe IKK et induit la translocation des dimères NF- κ B et l'activation des promoteurs à éléments de réponse κ B. Un effet de Tax2 dans le noyau n'est pas exclu mais reste à démontrer. Cette action ne nécessiterait de toute façon pas de SUMOylation ou de formation de corps nucléaires comme pour Tax1.

Même si notre étude nous a permis d'avancer dans la compréhension de l'activation de la voie NF- κ B à la fois par Tax1 et par Tax2 et de proposer de nouveaux modèles des

mécanismes moléculaires mis en jeu, de nouvelles questions ont également été soulevées, auxquelles ils nous faut maintenant répondre. La première d'entre elle est de déterminer si les corps nucléaires existent réellement dans les cellules infectées par le virus HTLV-1, ce qui d'après nos résultats et les différentes données présentées dans la littérature ne semble pas si évident, en tout cas dans une proportion notable de cellules. Il est également nécessaire de comprendre le rôle de la SUMOylation de Tax1 dans les nombreuses fonctions de Tax1. Cela passe par la compréhension des mécanismes régulant cette SUMOylation, les acides aminés P79 et Q81 paraissant en être un déterminant important. De la même façon, l'identification des enzymes impliquées dans l'ubiquitinylation de Tax1 en partenariat avec Ubc13 pourrait nous permettre d'élaborer des stratégies bloquant spécifiquement cette ubiquitinylation et l'activation de la voie NF- κ B. L'ubiquitine ligase TRAF5 pourrait être une candidate intéressante mais nous devons poursuivre notre étude sur cette protéine pour le confirmer et comprendre l'influence des autres membres de la famille des TRAF. Pour la protéine Tax2, maintenant que nous avons mis en évidence qu'un mécanisme différent de celui utilisé par Tax1 était impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B, nous devons identifier les partenaires cellulaires et les interactions mis en jeu.

D'une façon générale, nos études ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B induite par les protéines Tax1 et Tax2 et leurs régulations à l'échelle moléculaire et cellulaire. Il faut maintenant élargir notre étude à un contexte d'infection virale avec la présence de Tax au sein d'un génome viral pour pouvoir analyser l'influence des autres protéines virales, en particulier HBZ ou APH-2, sur les mécanismes d'activation de la voie NF- κ B et l'immortalisation des cellules par Tax.

BIBLIOGRAPHIE

- Achong, B. G., Mansell, P. W., Epstein, M. A. and Clifford, P.** (1971). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **46**, 299-307.
- Afonso, P. V., Mekaouche, M., Mortreux, F., Toulza, F., Moriceau, A., Wattel, E., Gessain, A., Bangham, C. R., Dubreuil, G., Plumelle, Y. et al.** (2010). Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* **116**, 3802-8.
- Afonso, P. V., Ozden, S., Cumont, M. C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A. et al.** (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog* **4**, e1000205.
- Afonso, P. V., Ozden, S., Prevost, M. C., Schmitt, C., Seilhean, D., Weksler, B., Couraud, P. O., Gessain, A., Romero, I. A. and Ceccaldi, P. E.** (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol* **179**, 2576-83.
- Akagi, T., Ono, H., Nyunoya, H. and Shimotohno, K.** (1997). Characterization of peripheral blood T-lymphocytes transduced with HTLV-I Tax mutants with different trans-activating phenotypes. *Oncogene* **14**, 2071-8.
- Akagi, T., Ono, H. and Shimotohno, K.** (1996). Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Oncogene* **12**, 1645-52.
- Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E. W., Grant, C. and Wigdahl, B.** (2003). Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J Biol Chem* **278**, 21814-22.
- Alefantis, T., Flaig, K. E., Wigdahl, B. and Jain, P.** (2007). Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomed Pharmacother* **61**, 194-200.
- Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C. and Wigdahl, B.** (2005). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J Biol Chem* **280**, 17353-62.
- Alexandre, C. and Verrier, B.** (1991). Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* **6**, 543-51.
- Andresen, V., Pise-Masison, C. A., Sinha-Datta, U., Bellon, M., Valeri, V., Washington Parks, R., Cecchinato, V., Fukumoto, R., Nicot, C. and Franchini, G.** (2011). Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* **118**, 1549-59.
- Araya, N., Sato, T., Yagishita, N., Ando, H., Utsunomiya, A., Jacobson, S. and Yamano, Y.** (2011). Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Viruses* **3**, 1532-48.
- Ariumi, Y., Ego, T., Kaida, A., Matsumoto, M., Pandolfi, P. P. and Shimotohno, K.** (2003). Distinct nuclear body components, PML and SMRT, regulate the trans-acting function of HTLV-1 Tax oncoprotein. *Oncogene* **22**, 1611-9.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J. Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y. and Shimotohno, K.** (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* **19**, 1491-9.
- Arnulf, B., Villemain, A., Nicot, C., Mordelet, E., Charneau, P., Kersual, J., Zermati, Y., Mauviel, A., Bazarbachi, A. and Hermine, O.** (2002). Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* **100**, 4129-38.
- Arpin-Andre, C. and Mesnard, J. M.** (2007). The PDZ domain-binding motif of the human T cell leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T cells. *J Biol Chem* **282**, 33132-41.
- Askjaer, P. and Kjems, J.** (1998). Mapping of multiple RNA binding sites of human T-cell lymphotropic virus type I rex protein within 5'- and 3'-Rex response elements. *J Biol Chem* **273**, 11463-71.

- Asquith, B., Mosley, A. J., Heaps, A., Tanaka, Y., Taylor, G. P., McLean, A. R. and Bangham, C. R.** (2005). Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. *Retrovirology* **2**, 75.
- Asquith, B., Zhang, Y., Mosley, A. J., de Lara, C. M., Wallace, D. L., Worth, A., Kaftantzi, L., Meekings, K., Griffin, G. E., Tanaka, Y. et al.** (2007). In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8035-40.
- Au, P. Y. and Yeh, W. C.** (2007). Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* **597**, 32-47.
- Avesani, F., Romanelli, M. G., Turci, M., Di Gennaro, G., Sampaio, C., Bidoia, C., Bertazzoni, U. and Bex, F.** (2010). Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Virology* **408**, 39-48.
- Azakami, K., Sato, T., Araya, N., Utsunomiya, A., Kubota, R., Suzuki, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S. et al.** (2009). Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* **114**, 3208-15.
- Azran, I., Jeang, K. T. and Aboud, M.** (2005). High levels of cytoplasmic HTLV-1 Tax mutant proteins retain a Tax-NF-kappaB-CBP ternary complex in the cytoplasm. *Oncogene* **24**, 4521-30.
- Bai, X. T., Sinha-Datta, U., Ko, N. L., Bellon, M. and Nicot, C.** (2012). Nuclear export and expression of human T-cell leukemia virus type 1 tax/rex mRNA are RxRE/Rex dependent. *J Virol* **86**, 4559-65.
- Ballard, D. W., Bohnlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, B. R. and Greene, W. C.** (1988). HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* **241**, 1652-5.
- Baltimore, D.** (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-11.
- Banerjee, P., Feuer, G. and Barker, E.** (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p121 down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. *J Virol* **81**, 9707-17.
- Bangham, C. R.** (2000). The immune response to HTLV-I. *Curr Opin Immunol* **12**, 397-402.
- Bangham, C. R., Meekings, K., Toulza, F., Nejmeddine, M., Majorovits, E., Asquith, B. and Taylor, G. P.** (2009). The immune control of HTLV-1 infection: selection forces and dynamics. *Front Biosci* **14**, 2889-903.
- Bangham, C. R. and Osame, M.** (2005). Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* **24**, 6035-46.
- Bangham, C. R. and Toulza, F.** (2011). Adult T cell leukemia/lymphoma: FoxP3(+) cells and the cell-mediated immune response to HTLV-1. *Adv Cancer Res* **111**, 163-82.
- Barbeau, B. and Mesnard, J. M.** (2011). Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses* **3**, 456-68.
- Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* **106**, 988-95.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. et al.** (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71.
- Barry, M. and Bleackley, R. C.** (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401-9.
- Basbous, J., Bazarbachi, A., Granier, C., Devaux, C. and Mesnard, J. M.** (2003). The central region of human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein contains distinct domains involved in subunit dimerization. *J Virol* **77**, 13028-35.

- Baydoun, H., Duc-Dodon, M., Lebrun, S., Gazzolo, L. and Bex, F.** (2007). Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins Tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* **386**, 191-201.
- Belgnaoui, S. M., Fryrear, K. A., Nyalwidhe, J. O., Guo, X. and Semmes, O. J.** (2010). The viral oncoprotein tax sequesters DNA damage response factors by tethering MDC1 to chromatin. *J Biol Chem* **285**, 32897-905.
- Bellon, M., Baydoun, H. H., Yao, Y. and Nicot, C.** (2010). HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* **115**, 2441-8.
- Bellon, M., Lepelletier, Y., Hermine, O. and Nicot, C.** (2009). Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* **113**, 4914-7.
- Belrose, G., Gross, A., Olindo, S., Lezin, A., Dueymes, M., Komla-Soukha, I., Smadja, D., Tanaka, Y., Willems, L., Mesnard, J. M. et al.** (2011). Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood* **118**, 2483-91.
- Beraud, C. and Greene, W. C.** (1996). Interaction of HTLV-I Tax with the human proteasome: implications for NF-kappa B induction. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13 Suppl 1**, S76-84.
- Bertazzoni, U., Turci, M., Avesani, F., Di Gennaro, G., Bidoia, C. and Romanelli, M. G.** (2011). Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses* **3**, 541-60.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A. and Gaynor, R.** (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol* **71**, 3484-97.
- Bex, F., Murphy, K., Wattiez, R., Burny, A. and Gaynor, R. B.** (1999). Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation. *J Virol* **73**, 738-45.
- Bex, F., Yin, M. J., Burny, A. and Gaynor, R. B.** (1998). Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol* **18**, 2392-405.
- Bhat, N. K., Adachi, Y., Samuel, K. P. and Derse, D.** (1993). HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. *Virology* **196**, 15-24.
- Bidoia, C., Mazzorana, M., Pagano, M. A., Arrigoni, G., Meggio, F., Pinna, L. A. and Bertazzoni, U.** (2010). The pleiotropic protein kinase CK2 phosphorylates HTLV-1 Tax protein in vitro, targeting its PDZ-binding motif. *Virus Genes* **41**, 149-57.
- Bieganowska, K., Hollsberg, P., Buckle, G. J., Lim, D. G., Greten, T. F., Schneck, J., Altman, J. D., Jacobson, S., Ledis, S. L., Hanchard, B. et al.** (1999). Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy. *J Immunol* **162**, 1765-71.
- Biggar, R. J., Ng, J., Kim, N., Hisada, M., Li, H. C., Cranston, B., Hanchard, B. and Maloney, E. M.** (2006). Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *J Infect Dis* **193**, 277-82.
- Bittencourt, A. L., da Gracas Vieira, M., Brites, C. R., Farre, L. and Barbosa, H. S.** (2007). Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. *Am J Clin Pathol* **128**, 875-82.
- Bittencourt, A. L., Sabino, E. C., Costa, M. C., Pedroso, C. and Moreira, L.** (2002). No evidence of vertical transmission of HTLV-I in bottle-fed children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **44**, 63-5.
- Blayney, D. W., Blattner, W. A., Jaffe, E. S. and Gallo, R. C.** (1983). Retroviruses in human leukemia. *Hematol Oncol* **1**, 193-204.
- Blot, V., Perugi, F., Gay, B., Prevost, M. C., Briant, L., Tangy, F., Abriel, H., Staub, O., Dokhelar, M. C. and Pique, C.** (2004). Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101

ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. *J Cell Sci* **117**, 2357-67.

Blumberg, B. S., Larouze, B., London, W. T., Werner, B., Hesser, J. E., Millman, I., Saimot, G. and Payet, M. (1975). The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am J Pathol* **81**, 669-82.

Bobrow, S. N., Smith, R. G., Reitz, M. S. and Gallo, R. C. (1972). Stimulated normal human lymphocytes contain a ribonuclease-sensitive DNA polymerase distinct from viral RNA-directed DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3228-32.

Bogenberger, J. M. and Laybourn, P. J. (2008). Human T Lymphotropic Virus Type 1 protein Tax reduces histone levels. *Retrovirology* **5**, 9.

Bogerd, H. P., Huckaby, G. L., Ahmed, Y. F., Hanly, S. M. and Greene, W. C. (1991). The type I human T-cell leukemia virus (HTLV-I) Rex trans-activator binds directly to the HTLV-I Rex and the type 1 human immunodeficiency virus Rev RNA response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5704-8.

Bomsel, M. and Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 57-68.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* **3**, 1151-7.

Bouzar, A. B. and Willems, L. (2008). How HTLV-1 may subvert miRNAs for persistence and transformation. *Retrovirology* **5**, 101.

Boxus, M., Twizere, J. C., Legros, S., Dewulf, J. F., Kettmann, R. and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* **5**, 76.

Boxus, M., Twizere, J. C., Legros, S., Kettmann, R. and Willems, L. (2012). Interaction of HTLV-1 Tax with minichromosome maintenance proteins accelerates the replication timing program. *Blood* **119**, 151-60.

Boxus, M. and Willems, L. (2012). How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells. *Retrovirology* **9**, 2.

Brady, J., Jeang, K. T., Duvall, J. and Khoury, G. (1987). Identification of p40x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J Virol* **61**, 2175-81.

Brauweiler, A., Garrus, J. E., Reed, J. C. and Nyborg, J. K. (1997). Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology* **231**, 135-40.

Brosnan, C. F., Selmaj, K. and Raine, C. S. (1988). Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **18**, 87-94.

Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M., Dirac, A. M. and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**, 797-801.

Burton, M., Upadhyaya, C. D., Maier, B., Hope, T. J. and Semmes, O. J. (2000). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J Virol* **74**, 2351-64.

Butel, J. S. (2000). Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* **21**, 405-26.

Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S. A., Mahieux, R., Froment, A. and Gessain, A. (2009). New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J Infect Dis* **199**, 561-4.

Calattini, S., Chevalier, S. A., Duprez, R., Afonso, P., Froment, A., Gessain, A. and Mahieux, R. (2006). Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol* **80**, 9876-88.

Calattini, S., Chevalier, S. A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R. and Gessain, A. (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* **2**, 30.

- Caron, C., Mengus, G., Dubrowskaya, V., Roisin, A., Davidson, I. and Jalinot, P.** (1997). Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3662-7.
- Caron, C., Rousset, R., Beraud, C., Moncollin, V., Egly, J. M. and Jalinot, P.** (1993). Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *Embo J* **12**, 4269-78.
- Carter, R. S., Geyer, B. C., Xie, M., Acevedo-Suarez, C. A. and Ballard, D. W.** (2001). Persistent activation of NF-kappa B by the tax transforming protein involves chronic phosphorylation of IkappaB kinase subunits IKKbeta and IKKgamma. *J Biol Chem* **276**, 24445-8.
- Cartier, L. and Ramirez, E.** (2005). Presence of HTLV-I Tax protein in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Arch Virol* **150**, 743-53.
- Casoli, C., De Lerma Barbaro, A., Pilotti, E., Bertazzoni, U., Tosi, G. and Accolla, R. S.** (2004). The MHC class II transcriptional activator (CIITA) inhibits HTLV-2 viral replication by blocking the function of the viral transactivator Tax-2. *Blood* **103**, 995-1001.
- Cavanagh, M. H., Landry, S., Audet, B., Arpin-Andre, C., Hivin, P., Pare, M. E., Thete, J., Wattel, E., Marriott, S. J., Mesnard, J. M. et al.** (2006). HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* **3**, 15.
- Cavrois, M., Gessain, A., Gout, O., Wain-Hobson, S. and Wattel, E.** (2000). Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J Infect Dis* **182**, 1044-50.
- Chandhasin, C., Ducu, R. I., Berkovich, E., Kastan, M. B. and Marriott, S. J.** (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 tax attenuates the ATM-mediated cellular DNA damage response. *J Virol* **82**, 6952-61.
- Charoenthongtrakul, S., Zhou, Q., Shembade, N., Harhaj, N. S. and Harhaj, E. W.** (2011). Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS1. *J Virol* **85**, 6955-62.
- Chaturvedi, M. M., Sung, B., Yadav, V. R., Kannappan, R. and Aggarwal, B. B.** (2011). NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* **30**, 1615-30.
- Chen, S., Ishii, N., Ine, S., Ikeda, S., Fujimura, T., Ndhlovu, L. C., Soroosh, P., Tada, K., Harigae, H., Kameoka, J. et al.** (2006). Regulatory T cell-like activity of Foxp3+ adult T cell leukemia cells. *Int Immunol* **18**, 269-77.
- Chen, X., Zachar, V., Zdravkovic, M., Guo, M., Ebbesen, P. and Liu, X.** (1997). Role of the Fas/Fas ligand pathway in apoptotic cell death induced by the human T cell lymphotropic virus type I Tax transactivator. *J Gen Virol* **78 (Pt 12)**, 3277-85.
- Chen, Z. J.** (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* **7**, 758-65.
- Chen, Z. J.** (2012). Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* **246**, 95-106.
- Cheng, H., Cenciarelli, C., Shao, Z., Vidal, M., Parks, W. P., Pagano, M. and Cheng-Mayer, C.** (2001). Human T cell leukemia virus type 1 Tax associates with a molecular chaperone complex containing hTid-1 and Hsp70. *Curr Biol* **11**, 1771-5.
- Cheng, J., Kydd, A. R., Nakase, K., Noonan, K. M., Murakami, A., Tao, H., Dwyer, M., Xu, C., Zhu, Q. and Marasco, W. A.** (2007). Negative regulation of the SH2-homology containing protein-tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) P2 promoter by the HTLV-1 Tax oncoprotein. *Blood* **110**, 2110-20.
- Chevalier, S. A., Meertens, L., Calattini, S., Gessain, A., Kiemer, L. and Mahieux, R.** (2005). Presence of a functional but dispensable nuclear export signal in the HTLV-2 Tax protein. *Retrovirology* **2**, 70.
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Chopin, C., Bex, F. and Pique, C.** (2004). Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol* **78**, 11823-32.
- Chieco-Bianchi, L., Saggioro, D., Del Mistro, A., Montaldo, A., Majone, F. and Levis, A. G.** (1988). Chromosome damage induced in cord blood T-lymphocytes infected in vitro by HTLV-I. *Leukemia* **2**, 223S-232S.

Ching, Y. P., Chan, S. F., Jeang, K. T. and Jin, D. Y. (2006). The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat Cell Biol* **8**, 717-24.

Ching, Y. P., Chun, A. C., Chin, K. T., Zhang, Z. Q., Jeang, K. T. and Jin, D. Y. (2004). Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology* **1**, 18.

Chlichlia, K., Busslinger, M., Peter, M. E., Walczak, H., Krammer, P. H., Schirmacher, V. and Khazaie, K. (1997). ICE-proteases mediate HTLV-I Tax-induced apoptotic T-cell death. *Oncogene* **14**, 2265-72.

Chlichlia, K. and Khazaie, K. (2010). HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem Biol Interact* **188**, 359-65.

Chlichlia, K., Moldenhauer, G., Daniel, P. T., Busslinger, M., Gazzolo, L., Schirmacher, V. and Khazaie, K. (1995). Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis. *Oncogene* **10**, 269-77.

Cho, W. K., Zhou, M., Jang, M. K., Huang, K., Jeong, S. J., Ozato, K. and Brady, J. N. (2007). Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *J Virol* **81**, 11179-86.

Chu, Z. L., DiDonato, J. A., Hawiger, J. and Ballard, D. W. (1998). The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *J Biol Chem* **273**, 15891-4.

Chu, Z. L., Shin, Y. A., Yang, J. M., DiDonato, J. A. and Ballard, D. W. (1999). IKKgamma mediates the interaction of cellular IkappaB kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem* **274**, 15297-300.

Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H. and Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* **115**, 679-88.

Ciechanover, A. and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* **14**, 103-6.

Ciuffo, G. (1907). Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *Giorn Ital Mal Venereol* **48**, 12-7.

Clemens, K. E., Piras, G., Radonovich, M. F., Choi, K. S., Duvall, J. F., DeJong, J., Roeder, R. and Brady, J. N. (1996). Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol Cell Biol* **16**, 4656-64.

Clerc, I., Polakowski, N., Andre-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J. M. and Lemasson, I. (2008). An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem* **283**, 23903-13.

Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, H. (1997). Retroviruses. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y. and Herbeuval, J. P. (2010). Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **115**, 2177-85.

Comité international de taxonomie des virus. (2011). Family Retroviridae. In *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (eds A. M. Q. King M. J. Adams E. B. Carsten and E. J. Lefkowitz), pp. 480-. San Diego: Academic Press.

Comité international de taxonomie des virus. (2011). Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press.

Courouce, A. M., Pillonel, J., Lemaire, J. M. and Saura, C. (1998). HTLV testing in blood transfusion. *Vox Sang* **74 Suppl 2**, 165-9.

- Crenon, I., Beraud, C., Simard, P., Montagne, J., Veschambre, P. and Jalinot, P. (1993). The transcriptionally active factors mediating the effect of the HTLV-I Tax transactivator on the IL-2R alpha kappa B enhancer include the product of the c-rel proto-oncogene. *Oncogene* **8**, 867-75.
- Cully, M., You, H., Levine, A. J. and Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **6**, 184-92.
- De Castro-Costa, C. M., Araujo, A. Q., Barreto, M. M., Takayanagui, O. M., Sohler, M. P., da Silva, E. L., de Paula, S. M., Ishak, R., Ribas, J. G., Roviroso, L. C. et al. (2006). Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 931-5.
- de The, G. and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 381-6.
- Derse, D., Hill, S. A., Lloyd, P. A., Chung, H. and Morse, B. A. (2001). Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol* **75**, 8461-8.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F. and Jalinot, P. (1996). Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* **273**, 951-3.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279-90.
- Dodon, M. D., Li, Z., Hamaia, S. and Gazzolo, L. (2004). Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J Gen Virol* **85**, 1921-32.
- Donegan, E., Busch, M. P., Galleshaw, J. A., Shaw, G. M. and Mosley, J. W. (1990). Transfusion of blood components from a donor with human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection. The Transfusion Safety Study Group. *Ann Intern Med* **113**, 555-6.
- Dooneief, G., Marlink, R., Bell, K., Marder, K., Renjifo, B., Stern, Y. and Mayeux, R. (1996). Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology* **46**, 1556-60.
- Dube, S., Bachman, S., Spicer, T., Love, J., Choi, D., Esteban, E., Ferrer, J. F. and Poiesz, B. J. (1997). Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1389-98.
- Ducu, R. I., Dayaram, T. and Marriott, S. J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* **416**, 1-8.
- Durkin, S. S., Guo, X., Fryrear, K. A., Mihaylova, V. T., Gupta, S. K., Belgnaoui, S. M., Haoudi, A., Kupfer, G. M. and Semmes, O. J. (2008). HTLV-1 Tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **283**, 36311-20.
- Durkin, S. S., Ward, M. D., Fryrear, K. A. and Semmes, O. J. (2006). Site-specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein. *J Biol Chem* **281**, 31705-12.
- Easley, R., Carpio, L., Guendel, I., Klase, Z., Choi, S., Kehn-Hall, K., Brady, J. N. and Kashanchi, F. (2010). Human T-lymphotropic virus type 1 transcription and chromatin-remodeling complexes. *J Virol* **84**, 4755-68.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M. F., Buchmann, C., Pise-Masison, C. A. and Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses* **3**, 861-85.
- El-Sabban, M. E., Nasr, R., Dbaiibo, G., Hermine, O., Abboushi, N., Quignon, F., Ameisen, J. C., Bex, F., de The, H. and Bazarbachi, A. (2000). Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation. *Blood* **96**, 2849-55.
- Ellermann, V. and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt Orig* **46**, 413-20.
- Elovaara, I., Koenig, S., Brewah, A. Y., Woods, R. M., Lehky, T. and Jacobson, S. (1993). High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med* **177**, 1567-73.

- Endo, K., Hirata, A., Iwai, K., Sakurai, M., Fukushi, M., Oie, M., Higuchi, M., Hall, W. W., Gejyo, F. and Fujii, M. (2002). Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than HTLV-1 Tax. *J Virol* **76**, 2648-53.
- Enose-Akahata, Y., Oh, U., Grant, C. and Jacobson, S. (2008). Retrovirally induced CTL degranulation mediated by IL-15 expression and infection of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood* **112**, 2400-10.
- Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G. and Barr, Y. M. (1965). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* **121**, 761-70.
- Fan, J., Ma, G., Nosaka, K., Tanabe, J., Satou, Y., Koito, A., Wain-Hobson, S., Vartanian, J. P. and Matsuoka, M. (2010). APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J Virol* **84**, 7278-87.
- Fan, N., Gavalchin, J., Paul, B., Wells, K. H., Lane, M. J. and Poiesz, B. J. (1992). Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J Clin Microbiol* **30**, 905-10.
- Feigal, E., Murphy, E., Vranizan, K., Bacchetti, P., Chaisson, R., Drummond, J. E., Blattner, W., McGrath, M., Greenspan, J. and Moss, A. (1991). Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *J Infect Dis* **164**, 36-42.
- Feng, X. and Ratner, L. (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 blunts signaling by interferon alpha. *Virology* **374**, 210-6.
- Feuer, G. and Green, P. L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* **24**, 5996-6004.
- Florins, A., Kettmann, R. and Willems, L. (2007). Le virus de la leucémie bovine et l'homéostasie du compartiment lymphocytaire périphérique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **11**, 69-78.
- Fogarty, K. H., Chen, Y., Grigsby, I. F., Macdonald, P. J., Smith, E. M., Johnson, J. L., Rawson, J. M., Mansky, L. M. and Mueller, J. D. (2011a). Characterization of cytoplasmic Gag-gag interactions by dual-color z-scan fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J* **100**, 1587-95.
- Fogarty, K. H., Zhang, W., Grigsby, I. F., Johnson, J. L., Chen, Y., Mueller, J. D. and Mansky, L. M. (2011b). New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses* **3**, 770-93.
- Fontes, J. D., Strawhecker, J. M., Bills, N. D., Lewis, R. E. and Hinrichs, S. H. (1993). Phorbol esters modulate the phosphorylation of human T-cell leukemia virus type I Tax. *J Virol* **67**, 4436-41.
- Franchini, G., Wong-Staal, F. and Gallo, R. C. (1984). Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6207-11.
- Fryrear, K. A., Durkin, S. S., Gupta, S. K., Tiedebohl, J. B. and Semmes, O. J. (2009). Dimerization and a novel Tax speckled structure localization signal are required for Tax nuclear localization. *J Virol* **83**, 5339-52.
- Fryrear, K. A., Guo, X., Kerscher, O. and Semmes, O. J. (2012). The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* **119**, 1173-81.
- Fu, D. X., Kuo, Y. L., Liu, B. Y., Jeang, K. T. and Giam, C. Z. (2003). Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **278**, 1487-93.
- Fu, J., Qu, Z., Yan, P., Ishikawa, C., Aqeilan, R. I., Rabson, A. B. and Xiao, G. (2011). The tumor suppressor gene WWOX links the canonical and noncanonical NF-kappaB pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Blood* **117**, 1652-61.
- Fujii, M., Iwai, K., Oie, M., Fukushi, M., Yamamoto, N., Kannagi, M. and Mori, N. (2000). Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1603-6.

- Fujii, M., Niki, T., Mori, T., Matsuda, T., Matsui, M., Nomura, N. and Seiki, M.** (1991). HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene* **6**, 1023-9.
- Fukuda, R. I., Tsuchiya, K., Suzuki, K., Itoh, K., Fujita, J., Utsunomiya, A. and Tsuji, T.** (2009). Human T-cell leukemia virus type I tax down-regulates the expression of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate inositol phosphatases via the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* **284**, 2680-9.
- Fukuda, R. I., Tsuchiya, K., Suzuki, K., Itoh, K., Fujita, J., Utsunomiya, A. and Tsuji, T.** (2012). HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF-kappaB pathway. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 95-104.
- Fukumoto, R., Dunder, M., Nicot, C., Adams, A., Valeri, V. W., Samelson, L. E. and Franchini, G.** (2007). Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(l) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *J Virol* **81**, 9088-99.
- Furukawa, Y., Kubota, R., Tara, M., Izumo, S. and Osame, M.** (2001). Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* **97**, 987-93.
- Gabet, A. S., Mortreux, F., Charneau, P., Riou, P., Duc-Dodon, M., Wu, Y., Jeang, K. T. and Wattel, E.** (2003). Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* **22**, 3734-41.
- Gao, M. and Karin, M.** (2005). Regulating the regulators: control of protein ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell* **19**, 581-93.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S.** (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* **146**, 1239-54.
- Gatza, M. L., Dayaram, T. and Marriott, S. J.** (2007). Ubiquitination of HTLV-I Tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* **4**, 95.
- Gatza, M. L. and Marriott, S. J.** (2006). Genotoxic stress and cellular stress alter the subcellular distribution of human T-cell leukemia virus type 1 tax through a CRM1-dependent mechanism. *J Virol* **80**, 6657-68.
- Gatza, M. L., Watt, J. C. and Marriott, S. J.** (2003). Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. *Oncogene* **22**, 5141-9.
- Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C. and Mesnard, J. M.** (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* **76**, 12813-22.
- Geleziunas, R., Ferrell, S., Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E. T., Jr., Grant, M., Connelly, M. A., Hambor, J. E., Marcu, K. B. and Greene, W. C.** (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* **18**, 5157-65.
- Gessain, A.** (2011). [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. *Bull Soc Pathol Exot* **104**, 167-80.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J. C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A. and de The, G.** (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **2**, 407-10.
- Gessain, A., Gallo, R. C. and Franchini, G.** (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* **66**, 2288-95.
- Gessain, A. and Mahieux, R.** (2012). Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris)* **168**, 257-69.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J. M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P. M., Heveker, N., Pique, C. et al.** (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* **80**, 6844-54.
- Ghorbel, S., Sinha-Datta, U., Dunder, M., Brown, M., Franchini, G. and Nicot, C.** (2006). Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem* **281**, 37150-8.

- Gilden, R. V., Long, C. W., Hanson, M., Toni, R., Charman, H. P., Oroszlan, S., Miller, J. M. and Van der Maaten, M. J.** (1975). Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* **29**, 305-14.
- Gill, G.** (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 536-41.
- Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A. et al.** (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* **4**, 18.
- Girdwood, D. W., Tatham, M. H. and Hay, R. T.** (2004). SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 201-10.
- Giri, A., Markham, P., Digilio, L., Hurteau, G., Gallo, R. C. and Franchini, G.** (1994). Isolation of a novel simian T-cell lymphotropic virus from Pan paniscus that is distantly related to the human T-cell leukemia/lymphotropic virus types I and II. *J Virol* **68**, 8392-5.
- Gitlin, S. D., Lindholm, P. F., Marriott, S. J. and Brady, J. N.** (1991). Transdominant human T-cell lymphotropic virus type I TAX1 mutant that fails to localize to the nucleus. *J Virol* **65**, 2612-21.
- Gohda, J., Irisawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ohtani, K., Fujisawa, J. and Inoue, J.** (2007). HTLV-1 Tax-induced NFkappaB activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 225-30.
- Goncalves, D. U., Proietti, F. A., Ribas, J. G., Araujo, M. G., Pinheiro, S. R., Guedes, A. C. and Carneiro-Proietti, A. B.** (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev* **23**, 577-89.
- Good, L., Maggirwar, S. B. and Sun, S. C.** (1996). Activation of the IL-2 gene promoter by HTLV-I tax involves induction of NF-AT complexes bound to the CD28-responsive element. *Embo J* **15**, 3744-50.
- Goren, I., Semmes, O. J., Jeang, K. T. and Moelling, K.** (1995). The amino terminus of Tax is required for interaction with the cyclic AMP response element binding protein. *J Virol* **69**, 5806-11.
- Goubau, P., Van Brussel, M., Vandamme, A. M., Liu, H. F. and Desmyter, J.** (1994). A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (*Papio hamadryas*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2848-52.
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. and Ramstedt, U.** (1992). Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J Virol* **66**, 4570-5.
- Grigsby, I. F., Zhang, W., Johnson, J. L., Fogarty, K. H., Chen, Y., Rawson, J. M., Crosby, A. J., Mueller, J. D. and Mansky, L. M.** (2010). Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology* **7**, 75.
- Grone, M., Koch, C. and Grassmann, R.** (1996). The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation. *Virology* **218**, 316-25.
- Gross, L.** (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med* **76**, 27-32.
- Grossman, W. J., Kimata, J. T., Wong, F. H., Zutter, M., Ley, T. J. and Ratner, L.** (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1057-61.
- Gu, T., Zhang, Z., Wang, J., Guo, J., Shen, W. H. and Yin, Y.** (2011). CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res* **71**, 2821-5.
- Guo, H. G., Wong-Stall, F. and Gallo, R. C.** (1984). Novel viral sequences related to human T-cell leukemia virus in T cells of a seropositive baboon. *Science* **223**, 1195-7.
- Gupta, S. K., Guo, X., Durkin, S. S., Fryrear, K. F., Ward, M. D. and Semmes, O. J.** (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein prevents DNA damage-induced chromatin egress of hyperphosphorylated Chk2. *J Biol Chem* **282**, 29431-40.
- Habelhah, H., Takahashi, S., Cho, S. G., Kadoya, T., Watanabe, T. and Ronai, Z.** (2004). Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *Embo J* **23**, 322-32.

- Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S. and Shida, H.** (1998). Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* **72**, 6602-7.
- Hall, A. P., Irvine, J., Blyth, K., Cameron, E. R., Onions, D. E. and Campbell, M. E.** (1998). Tumours derived from HTLV-I tax transgenic mice are characterized by enhanced levels of apoptosis and oncogene expression. *J Pathol* **186**, 209-14.
- Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K. T. and Grassmann, R.** (2002). Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **22**, 3327-38.
- Hanon, E., Hall, S., Taylor, G. P., Saito, M., Davis, R., Tanaka, Y., Usuku, K., Osame, M., Weber, J. N. and Bangham, C. R.** (2000a). Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **95**, 1386-92.
- Hanon, E., Stinchcombe, J. C., Saito, M., Asquith, B. E., Taylor, G. P., Tanaka, Y., Weber, J. N., Griffiths, G. M. and Bangham, C. R.** (2000b). Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* **13**, 657-64.
- Haoudi, A., Daniels, R. C., Wong, E., Kupfer, G. and Semmes, O. J.** (2003). Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. *J Biol Chem* **278**, 37736-44.
- Haoudi, A. and Semmes, O. J.** (2003). The HTLV-1 tax oncoprotein attenuates DNA damage induced G1 arrest and enhances apoptosis in p53 null cells. *Virology* **305**, 229-39.
- Hara, T., Matsumura-Arioka, Y., Ohtani, K. and Nakamura, M.** (2008). Role of human T-cell leukemia virus type I Tax in expression of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human T-cells. *Cancer Sci* **99**, 1155-63.
- Harhaj, E. W. and Dixit, V. M.** (2012). Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunol Rev* **246**, 107-24.
- Harhaj, E. W. and Sun, S. C.** (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem* **274**, 22911-4.
- Harhaj, N. S., Sun, S. C. and Harhaj, E. W.** (2007). Activation of NF-kappa B by the human T cell leukemia virus type I Tax oncoprotein is associated with ubiquitin-dependent relocalization of I kappa B kinase. *J Biol Chem* **282**, 4185-92.
- Harrison, M. S., Schmitt, P. T., Pei, Z. and Schmitt, A. P.** (2012). Role of ubiquitin in parainfluenza virus 5 particle formation. *J Virol* **86**, 3474-85.
- Harrod, R., Kuo, Y. L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y. and Giam, C. Z.** (2000). p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem* **275**, 11852-7.
- Harrod, R., Tang, Y., Nicot, C., Lu, H. S., Vassilev, A., Nakatani, Y. and Giam, C. Z.** (1998). An exposed KID-like domain in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300. *Mol Cell Biol* **18**, 5052-61.
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M. J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H. et al.** (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* **12**, 466-72.
- Hashimoto, K., Higuchi, I., Osame, M. and Izumo, S.** (1998). Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. *J Neurol Sci* **159**, 67-72.
- Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M. F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., Devergne, O. and Tsapis, A.** (2000). TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol* **165**, 1322-30.

- Hayashi, D., Kubota, R., Takenouchi, N., Tanaka, Y., Hirano, R., Takashima, H., Osame, M., Izumo, S. and Arimura, K. (2008). Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* **200**, 115-24.
- Heidecker, G., Lloyd, P. A., Fox, K., Nagashima, K. and Derse, D. (2004). Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J Virol* **78**, 6636-48.
- Herchenroder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E. K., Murthy, K. K., Schneider, J., Mergia, A. and Luciw, P. A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* **201**, 187-99.
- Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M. and Seiki, M. (1988). Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *Embo J* **7**, 519-23.
- Hieshima, K., Nagakubo, D., Nakayama, T., Shirakawa, A. K., Jin, Z. and Yoshie, O. (2008). Tax-inducible production of CC chemokine ligand 22 by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells promotes preferential transmission of HTLV-1 to CCR4-expressing CD4+ T cells. *J Immunol* **180**, 931-9.
- Higuchi, M., Tsubata, C., Kondo, R., Yoshida, S., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Mahieux, R., Matsuoka, M. and Fujii, M. (2007). Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line. *J Virol* **81**, 11900-7.
- Hilburn, S., Rowan, A., Demontis, M. A., MacNamara, A., Asquith, B., Bangham, C. R. and Taylor, G. P. In vivo expression of human T-lymphotropic virus type 1 basic leucine-zipper protein generates specific CD8+ and CD4+ T-lymphocyte responses that correlate with clinical outcome. *J Infect Dis* **203**, 529-36.
- Hino, S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **87**, 152-66.
- Hinuma, Y., Komoda, H., Chosa, T., Kondo, T., Kohakura, M., Takenaka, T., Kikuchi, M., Ichimaru, M., Yunoki, K., Sato, I. et al. (1982). Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer* **29**, 631-5.
- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K. I., Shirakawa, S. and Miyoshi, I. (1981). Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6476-80.
- Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Inoue, J. and Yoshida, M. (1994). Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3584-8.
- Hirata, A., Higuchi, M., Niinuma, A., Ohashi, M., Fukushima, M., Oie, M., Akiyama, T., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M. (2004). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* **318**, 327-36.
- Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N. and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol* **125**, 568-75.
- Hjelle, B., Appenzeller, O., Mills, R., Alexander, S., Torrez-Martinez, N., Jahnke, R. and Ross, G. (1992). Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* **339**, 645-6.
- Hjerpe, R. and Rodriguez, M. S. (2008). Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans* **36**, 823-7.
- Hjerpe, R., Thomas, Y., Chen, J., Zemla, A., Curran, S., Shpiro, N., Dick, L. R. and Kurz, T. (2012). Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem J* **441**, 927-36.
- Hlela, C., Shepperd, S., Khumalo, N. P. and Taylor, G. P. (2009). The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *AIDS Rev* **11**, 205-14.

- Ho, Y. K., Zhi, H., DeBiaso, D., Philip, S., Shih, H. M. and Giam, C. Z.** (2012). HTLV-1 Tax-Induced Rapid Senescence Is Driven by the Transcriptional Activity of NF-kappaB and Depends on Chronically Activated IKKalpha and p65/RelA. *J Virol* **86**, 9474-83.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., Wagner, S., Rogov, V., Dotsch, V. and Dikic, I.** (2007). E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell* **26**, 891-8.
- Hoppe, T.** (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* **30**, 183-7.
- Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z. and Cao, X.** (2009). MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* **183**, 2150-8.
- Hoxie, J. A., Matthews, D. M. and Cines, D. B.** (1984). Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7591-5.
- Hoyos, B., Ballard, D. W., Bohnlein, E., Siekevitz, M. and Greene, W. C.** (1989). Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* **244**, 457-60.
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y. and Cheng, H.** (2009). HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks IkappaB kinases to the microdomains for persistent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* **284**, 6208-17.
- Huang, Y., Ohtani, K., Iwanaga, R., Matsumura, Y. and Nakamura, M.** (2001). Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* **20**, 1094-102.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (2012). A review of human carcinogens : Biological agents. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M. and Bangham, C. R.** (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**, 1713-6.
- Ikezoe, T., Nishioka, C., Bandobashi, K., Yang, Y., Kuwayama, Y., Adachi, Y., Takeuchi, T., Koeffler, H. P. and Taguchi, H.** (2007). Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res* **31**, 673-82.
- Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S. and Yoshida, M.** (1986). Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *Embo J* **5**, 2883-8.
- Inuzuka, H., Tseng, A., Gao, D., Zhai, B., Zhang, Q., Shaik, S., Wan, L., Ang, X. L., Mock, C., Yin, H. et al.** (2010). Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **18**, 147-59.
- Ishii, T., Ishida, T., Utsunomiya, A., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Imada, K., Uchiyama, T., Akinaga, S. et al.** (2010). Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* **16**, 1520-31.
- Isono, T., Ogawa, K. and Seto, A.** (1990). Antiviral effect of zidovudine in the experimental model of adult T cell leukemia in rabbits. *Leuk Res* **14**, 841-7.
- Itoyama, T., Sadamori, N., Tokunaga, S., Sasagawa, I., Nakamura, H., Yao, E., Jubashi, T., Yamada, Y., Ikeda, S. and Ichimaru, M.** (1990). Cytogenetic studies of human T-cell leukemia virus type I carriers. A family study. *Cancer Genet Cytogenet* **49**, 157-63.
- Iwai, K.** (2012). Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation. *Trends Cell Biol* **22**, 355-64.
- Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N. and Fujii, M.** (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* **279**, 38-46.
- Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T. and Nakamura, M.** (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* **20**, 2055-67.
- Izumo, S.** (2010). Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology*.

- Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D. E., Fauci, A. S. and Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* **348**, 245-8.
- Jain, P., Mostoller, K., Flaig, K. E., Ahuja, J., Lepoutre, V., Alefantis, T., Khan, Z. K. and Wigdahl, B. (2007). Identification of human T cell leukemia virus type 1 tax amino acid signals and cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *J Biol Chem* **282**, 34581-93.
- Javier, R. T. and Butel, J. S. (2008). The history of tumor virology. *Cancer Res* **68**, 7693-706.
- Jeang, K. T. (2010a). HTLV-1 and adult T-cell leukemia: insights into viral transformation of cells 30 years after virus discovery. *J Formos Med Assoc* **109**, 688-93.
- Jeang, K. T. (2010b). Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and oncogene or oncomiR addiction? *Oncotarget* **1**, 453-6.
- Jeang, K. T., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M. and Khoury, G. (1988). Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J Virol* **62**, 4499-509.
- Jeang, K. T., Widen, S. G., Semmes, O. J. t. and Wilson, S. H. (1990). HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* **247**, 1082-4.
- Jeffery, K. J., Siddiqui, A. A., Bunce, M., Lloyd, A. L., Vine, A. M., Witkover, A. D., Izumo, S., Usuku, K., Welsh, K. I., Osame, M. et al. (2000). The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol* **165**, 7278-84.
- Jeffery, K. J., Usuku, K., Hall, S. E., Matsumoto, W., Taylor, G. P., Procter, J., Bunce, M., Ogg, G. S., Welsh, K. I., Weber, J. N. et al. (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3848-53.
- Jeong, S. J., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Park, H. U. and Brady, J. N. (2005a). Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* **24**, 6719-28.
- Jeong, S. J., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Park, H. U. and Brady, J. N. (2005b). A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 Inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J Biol Chem* **280**, 10326-32.
- Jeong, S. J., Radonovich, M., Brady, J. N. and Pise-Masison, C. A. (2004). HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity. *Blood* **104**, 1490-7.
- Jeong, S. J., Ryo, A. and Yamamoto, N. (2009). The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **381**, 294-9.
- Jiang, H., Lu, H., Schiltz, R. L., Pise-Masison, C. A., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y. and Brady, J. N. (1999). PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol Cell Biol* **19**, 8136-45.
- Jin, D. Y., Giordano, V., Kibler, K. V., Nakano, H. and Jeang, K. T. (1999). Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J Biol Chem* **274**, 17402-5.
- Jin, D. Y. and Jeang, K. T. (1997). HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res* **25**, 379-87.
- Jin, D. Y., Spencer, F. and Jeang, K. T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* **93**, 81-91.
- Jin, D. Y., Teramoto, H., Giam, C. Z., Chun, R. F., Gutkind, J. S. and Jeang, K. T. (1997). A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* **272**, 25816-23.
- Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A. K., Nakayama, T., Shigeta, A., Hieshima, K., Yamada, Y. and Yoshie, O. (2009). CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int J Cancer* **125**, 2229-35.

- Johnson, J. M., Mulloy, J. C., Ciminale, V., Fullen, J., Nicot, C. and Franchini, G.** (2000). The MHC class I heavy chain is a common target of the small proteins encoded by the 3' end of HTLV type 1 and HTLV type 2. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1777-81.
- Jones, K. S., Akel, S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D. C. and Ruscetti, F. W.** (2005). Induction of human T cell leukemia virus type I receptors on quiescent naive T lymphocytes by TGF-beta. *J Immunol* **174**, 4262-70.
- Jones, K. S., Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D. C., Lisinski, I., Cushman, S. W., Jacobson, S. and Ruscetti, F. W.** (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol* **80**, 8291-302.
- Jones, K. S., Lambert, S., Bouttier, M., Benit, L., Ruscetti, F. W., Hermine, O. and Pique, C.** (2011). Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* **3**, 794-810.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y. K., Bertolette, D. C. and Ruscetti, F. W.** (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* **14**, 429-36.
- Journio, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S. A., Afonso, P. V., Brady, J. N., Flynn, D., Tangy, F., Israel, A., Vidalain, P. O. et al.** (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog* **5**, e1000521.
- Kaiser, T. E., Intine, R. V. and Dundr, M.** (2008). De novo formation of a subnuclear body. *Science* **322**, 1713-7.
- Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Poiesz, B., Ruscetti, F. W. and Gallo, R. C.** (1981). Immunological properties of a type C retrovirus isolated from cultured human T-lymphoma cells and comparison to other mammalian retroviruses. *J Virol* **38**, 906-15.
- Kalyanaraman, V. S., Sarngadharan, M. G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D. and Gallo, R. C.** (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 571-3.
- Kanda, J., Hishizawa, M., Utsunomiya, A., Taniguchi, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Tanosaki, R., Kawano, F., Miyazaki, Y., Masuda, M. et al.** (2012). Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* **119**, 2141-8.
- Kannian, P. and Green, P. L.** (2010). Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* **2**, 2037-77.
- Kannian, P., Yin, H., Doueiri, R., Lairmore, M. D., Fernandez, S. and Green, P. L.** (2012). Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J Virol* **86**, 3757-66.
- Kao, A. L., Lin, Y. H., Chen, R. P., Huang, Y. Y., Chen, C. C. and Yang, C. C.** (2012). E3-independent ubiquitination of AtMAPR/MSBP1. *Phytochemistry* **78**, 7-19.
- Kao, S. Y., Lemoine, F. J. and Mariott, S. J.** (2000). HTLV-1 Tax protein sensitizes cells to apoptotic cell death induced by DNA damaging agents. *Oncogene* **19**, 2240-8.
- Kao, S. Y. and Marriott, S. J.** (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* **73**, 4299-304.
- Karube, K., Aoki, R., Sugita, Y., Yoshida, S., Nomura, Y., Shimizu, K., Kimura, Y., Hashikawa, K., Takeshita, M., Suzumiya, J. et al.** (2008). The relationship of FOXP3 expression and clinicopathological characteristics in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Mod Pathol* **21**, 617-25.
- Kasai, T., Iwanaga, Y., Iha, H. and Jeang, K. T.** (2002). Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J Biol Chem* **277**, 5187-93.
- Kasai, T. and Jeang, K. T.** (2004). Two discrete events, human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein expression and a separate stress stimulus, are required for induction of apoptosis in T-cells. *Retrovirology* **1**, 7.
- Kashanchi, F. and Brady, J. N.** (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* **24**, 5938-51.

- Kawakami, A., Nakashima, T., Sakai, H., Urayama, S., Yamasaki, S., Hida, A., Tsuboi, M., Nakamura, H., Ida, H., Migita, K. et al. (1999). Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* **94**, 3847-54.
- Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Mori, N. (2005). Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int J Cancer* **115**, 967-74.
- Kazanji, M. (2000). HTLV type 1 infection in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): a promising animal model for HTLV type 1 human infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1741-6.
- Kazanji, M., Tartaglia, J., Franchini, G., de Thois, B., Talarmin, A., Contamin, H., Gessain, A. and de The, G. (2001). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 NYVAC and naked DNA vaccine candidates in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Virol* **75**, 5939-48.
- Kchour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M. M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H. et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* **113**, 6528-32.
- Kehn, K., Fuente Cde, L., Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., Mahieux, R., Pumfery, A., Bottazzi, M. E. and Kashanchi, F. (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* **24**, 525-40.
- Kendall, E. A., Gonzalez, E., Espinoza, I., Tipismana, M., Verdonck, K., Clark, D., Vermund, S. H. and Gotuzzo, E. (2009). Early neurologic abnormalities associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in a cohort of Peruvian children. *J Pediatr* **155**, 700-6.
- Kensche, T., Tokunaga, F., Ikeda, F., Goto, E., Iwai, K. and Dikic, I. (2012). Analysis of Nuclear Factor-kappaB (NF-kappaB) Essential Modulator (NEMO) Binding to Linear and Lysine-linked Ubiquitin Chains and Its Role in the Activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* **287**, 23626-34.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159-80.
- Keshet, Y. and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* **661**, 3-38.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Favre-Bonvin, A., El-Sabban, M., Renault, N., Giron, M. L., Setterblad, N., Hajj, H. E., Chiari, E., Mikati, A. G. et al. (2008). Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* **27**, 1665-76.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Journo, C., Mahieux, R., Pique, C. and Bazarbachi, A. (2012). The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-kappaB activation. *Adv Cancer Res* **113**, 85-120.
- Kfoury, Y., Setterblad, N., El-Sabban, M., Zamborlini, A., Dassouki, Z., El Hajj, H., Hermine, O., Pique, C., de The, H., Saib, A. et al. (2011). Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* **117**, 190-9.
- Kibler, K. V. and Jeang, K. T. (2001). CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* **75**, 2161-73.
- Kim, F. J., Manel, N., Garrido, E. N., Valle, C., Sitbon, M. and Battini, J. L. (2004). HTLV-1 and -2 envelope SU subdomains and critical determinants in receptor binding. *Retrovirology* **1**, 41.
- Kim, Y. M., Geiger, T. R., Egan, D. I., Sharma, N. and Nyborg, J. K. (2010). The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* **29**, 2142-52.
- Kim, Y. M., Ramirez, J. A., Mick, J. E., Giebler, H. A., Yan, J. P. and Nyborg, J. K. (2007). Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem* **282**, 18750-7.
- Kimura, Y. and Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* **147**, 793-8.

- Kimzey, A. L. and Dynan, W. S.** (1998). Specific regions of contact between human T-cell leukemia virus type I Tax protein and DNA identified by photocross-linking. *J Biol Chem* **273**, 13768-75.
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J. M., Jr. and Jeang, K. T.** (2010). Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *J Virol* **84**, 5431-7.
- Kinpara, S., Hasegawa, A., Utsunomiya, A., Nishitsuji, H., Furukawa, H., Masuda, T. and Kannagi, M.** (2009). Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J Virol* **83**, 5101-8.
- Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D. A., Xu, X. and Nerenberg, M.** (1993). Ablation of transplanted HTLV-I tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kappa B. *Science* **259**, 1523.
- Kobe, B., Center, R. J., Kemp, B. E. and Pombourios, P.** (1999). Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4319-24.
- Koga, H., Ohshima, T. and Shimotohno, K.** (2004). Enhanced activation of tax-dependent transcription of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) long terminal repeat by TORC3. *J Biol Chem* **279**, 52978-83.
- Kohno, T., Yamada, Y., Akamatsu, N., Kamihira, S., Imaizumi, Y., Tomonaga, M. and Matsuyama, T.** (2005). Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer Sci* **96**, 527-33.
- Koiwa, T., Hamano-Usami, A., Ishida, T., Okayama, A., Yamaguchi, K., Kamihira, S. and Watanabe, T.** (2002). 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol* **76**, 9389-97.
- Komander, D. and Rape, M.** (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-29.
- Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J. D., Odenwaelde, P., Wilkinson, K. D. and Barford, D.** (2009). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **10**, 466-73.
- Koralnik, I. J., Boeri, E., Saxinger, W. C., Monico, A. L., Fullen, J., Gessain, A., Guo, H. G., Gallo, R. C., Markham, P., Kalyanaraman, V. et al.** (1994). Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol* **68**, 2693-707.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. and Courtois, G.** (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801-5.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I. and Yamamoto, N.** (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* **196**, 25-33.
- Krueger, A., Fas, S. C., Giaisi, M., Bleumink, M., Merling, A., Stumpf, C., Baumann, S., Holtkotte, D., Bosch, V., Krammer, P. H. et al.** (2006). HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* **107**, 3933-9.
- Ku, S. C., Lee, J., Lau, J., Gurumurthy, M., Ng, R., Lwa, S. H., Lee, J., Klase, Z., Kashanchi, F. and Chao, S. H.** (2008). XBP-1, a novel human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax binding protein, activates HTLV-1 basal and tax-activated transcription. *J Virol* **82**, 4343-53.
- Kubota, R., Fujiyoshi, T., Izumo, S., Yashiki, S., Maruyama, I., Osame, M. and Sonoda, S.** (1993). Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* **42**, 147-54.
- Kuhlmann, A. S., Villaudy, J., Gazzolo, L., Castellazzi, M., Mesnard, J. M. and Duc Dodon, M.** (2007). HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* **4**, 92.
- Kuo, Y. L. and Giam, C. Z.** (2006). Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *Embo J* **25**, 1741-52.

- Kuroda, Y. and Matsui, M.** (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* **42**, 223-6.
- Kwok, R. P., Lurance, M. E., Lundblad, J. R., Goldman, P. S., Shih, H., Connor, L. M., Marriott, S. J. and Goodman, R. H.** (1996). Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature* **380**, 642-6.
- Lacoste, J., Petropoulos, L., Pepin, N. and Hiscott, J.** (1995). Constitutive phosphorylation and turnover of I kappa B alpha in human T-cell leukemia virus type I-infected and Tax-expressing T cells. *J Virol* **69**, 564-9.
- Laherty, C. D., Perkins, N. D. and Dixit, V. M.** (1993). Human T cell leukemia virus type I Tax and phorbol 12-myristate 13-acetate induce expression of the A20 zinc finger protein by distinct mechanisms involving nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* **268**, 5032-9.
- Lairmore, M. D. and Franchini, G.** (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 and 2. In *Fields virology*, (eds B. N. Fields D. M. Knipe and P. M. Howley), pp. 2072-2105. Philadelphia, Pa. ; London: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Lairmore, M. D., Haines, R. and Anupam, R.** (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol*.
- Lal, R. B., Owen, S. M., Rudolph, D. L., Dawson, C. and Prince, H.** (1995). In vivo cellular tropism of human T-lymphotropic virus type II is not restricted to CD8+ cells. *Virology* **210**, 441-7.
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B. and de The, H.** (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* **10**, 547-55.
- Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F. W., Perret, G., Jones, K. S. et al.** (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* **113**, 5176-85.
- Lamothe, B., Besse, A., Campos, A. D., Webster, W. K., Wu, H. and Darnay, B. G.** (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J Biol Chem* **282**, 4102-12.
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R. B. and Bex, F.** (2005). Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* **25**, 10391-406.
- Lanoix, J., Lacoste, J., Pepin, N., Rice, N. and Hiscott, J.** (1994). Overproduction of NFKB2 (I κ B-10) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated trans-activation via the NF-kappa B signalling pathway. *Oncogene* **9**, 841-52.
- Larocca, D., Chao, L. A., Seto, M. H. and Brunck, T. K.** (1989). Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 1006-13.
- Lavorgna, A. and Harhaj, E. W.** (2012). An RNA interference screen identifies the Deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF-kappaB activation. *J Virol* **86**, 3357-69.
- Le Blanc, I., Rosenberg, A. R. and Dokhelar, M. C.** (1999). Multiple functions for the basic amino acids of the human T-cell leukemia virus type 1 matrix protein in viral transmission. *J Virol* **73**, 1860-7.
- Lee, M. H. and Miyamoto, S.** (2011). Expanding NFkappaB and SUMO ties. *Cell Cycle* **10**, 3983-4.
- Lehky, T. J., Fox, C. H., Koenig, S., Levin, M. C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C. S., Osame, M. and Jacobson, S.** (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann Neurol* **37**, 167-75.
- Lemasson, I., Polakowski, N. J., Laybourn, P. J. and Nyborg, J. K.** (2004). Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol Cell Biol* **24**, 6117-26.

- Lemoine, F. J., Kao, S. Y. and Marriott, S. J.** (2000). Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1623-7.
- Lemoine, F. J. and Marriott, S. J.** (2001). Accelerated G(1) phase progression induced by the human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) Tax oncoprotein. *J Biol Chem* **276**, 31851-7.
- Lepoutre, V., Jain, P., Quann, K., Wigdahl, B. and Khan, Z. K.** (2009). Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci* **14**, 1152-68.
- Levin, M. C., Lee, S. M., Morcos, Y., Brady, J. and Stuart, J.** (2002). Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. *J Infect Dis* **186**, 1514-7.
- Lezin, A., Gillet, N., Olindo, S., Signate, A., Grandvaux, N., Verlaeten, O., Belrose, G., de Carvalho Bittencourt, M., Hiscott, J., Asquith, B. et al.** (2007). Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* **110**, 3722-8.
- Lezin, A., Olindo, S., Belrose, G., Signate, A., Cesaire, R., Smadja, D., Macallan, D., Asquith, B., Bangham, C., Bouzar, A. et al.** (2009). Gene activation therapy: from the BLV model to HAM/TSP patients. *Front Biosci (Schol Ed)* **1**, 205-15.
- Li, H. C., Biggar, R. J., Miley, W. J., Maloney, E. M., Cranston, B., Hanchard, B. and Hisada, M.** (2004). Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis* **190**, 1275-8.
- Liang, M. H., Geisbert, T., Yao, Y., Hinrichs, S. H. and Giam, C. Z.** (2002). Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes S-phase entry but blocks mitosis. *J Virol* **76**, 4022-33.
- Liegeois, F., Lafay, B., Switzer, W. M., Locatelli, S., Mpoudi-Ngole, E., Loul, S., Heneine, W., Delaporte, E. and Peeters, M.** (2008). Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. *Virology* **371**, 405-17.
- Liu, B., Hong, S., Tang, Z., Yu, H. and Giam, C. Z.** (2005). HTLV-I Tax directly binds the Cdc20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 63-8.
- Liu, B., Liang, M. H., Kuo, Y. L., Liao, W., Boros, I., Kleinberger, T., Blancato, J. and Giam, C. Z.** (2003). Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes unscheduled degradation of Pds1p/securin and Clb2p/cyclin B1 and causes chromosomal instability. *Mol Cell Biol* **23**, 5269-81.
- Liu, H. F., Vandamme, A. M., Van Brussel, M., Desmyter, J. and Goubau, P.** (1994). New retroviruses in human and simian T-lymphotropic viruses. *Lancet* **344**, 265-6.
- Liu, M., Yang, L., Zhang, L., Liu, B., Merling, R., Xia, Z. and Giam, C. Z.** (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 infection leads to arrest in the G1 phase of the cell cycle. *J Virol* **82**, 8442-55.
- Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Masuda, S., Tokioka, T., Yamaoka, S., Maruyama, I. and Kitajima, I.** (2001). Phosphoinositide-3 kinase-PKB/Akt pathway activation is involved in fibroblast Rat-1 transformation by human T-cell leukemia virus type I tax. *Oncogene* **20**, 2514-26.
- Livengood, J. A. and Nyborg, J. K.** (2004). The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res* **32**, 2829-37.
- Lobjois, V.** (2005). [Cycling without D-type cyclin]. *Med Sci (Paris)* **21**, 19-22.
- Lobrich, M. and Jeggo, P. A.** (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* **7**, 861-9.
- Lodewick, J., Lamsoul, I. and Bex, F.** (2011). Move or die: the fate of the Tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* **3**, 829-57.
- Lodewick, J., Lamsoul, I., Polania, A., Lebrun, S., Burny, A., Ratner, L. and Bex, F.** (2009). Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* **386**, 68-78.
- Los, M., Khazaie, K., Schulze-Osthoff, K., Baeuerle, P. A., Schirmacher, V. and Chlichlia, K.** (1998). Human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) Tax-mediated apoptosis in activated T cells requires an enhanced intracellular prooxidant state. *J Immunol* **161**, 3050-5.

- Low, K. G., Dorner, L. F., Fernando, D. B., Grossman, J., Jeang, K. T. and Comb, M. J.** (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax releases cell cycle arrest induced by p16INK4a. *J Virol* **71**, 1956-62.
- Lu, H., Pise-Masison, C. A., Fletcher, T. M., Schiltz, R. L., Nagaich, A. K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P. A. and Brady, J. N.** (2002). Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Mol Cell Biol* **22**, 4450-62.
- Lu, H., Pise-Masison, C. A., Linton, R., Park, H. U., Schiltz, R. L., Sartorelli, V. and Brady, J. N.** (2004). Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* **78**, 6735-43.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P., Laurance, M. E., Huang, M. S., Richards, J. P., Brennan, R. G. and Goodman, R. H.** (1998). The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove. *J Biol Chem* **273**, 19251-9.
- Ma, J. K., Platt, M. Y., Eastham-Anderson, J., Shin, J. S. and Mellman, I.** (2012). MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8820-7.
- Mabb, A. M. and Miyamoto, S.** (2007). SUMO and NF-kappaB ties. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1979-96.
- Macatonia, S. E., Cruickshank, J. K., Rudge, P. and Knight, S. C.** (1992). Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1699-706.
- Macchi, B., Faraoni, I., Zhang, J., Grelli, S., Favalli, C., Mastino, A. and Bonmassar, E.** (1997). AZT inhibits the transmission of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I to adult peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Gen Virol* **78** (Pt 5), 1007-16.
- Mackay, J. L., Jemal, A., Lee, N. C. and Parkin, D. M.** (2006). The cancer atlas. Atlanta, Ga.: American Cancer Society.
- Macnamara, A., Rowan, A., Hilburn, S., Kadolsky, U., Fujiwara, H., Suemori, K., Yasukawa, M., Taylor, G., Bangham, C. R. and Asquith, B.** (2010). HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathog* **6**, e1001117.
- Maerz, A. L., Center, R. J., Kemp, B. E., Kobe, B. and Pombourios, P.** (2000). Functional implications of the human T-lymphotropic virus type 1 transmembrane glycoprotein helical hairpin structure. *J Virol* **74**, 6614-21.
- Mahieux, R. and Gessain, A.** (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* **3**, 1074-90.
- Mahieux, R. and Hermine, O.** (2005). In vivo and in vitro treatment of HTLV-1 and HTLV-2 infected cells with arsenic trioxide and interferon-alpha. *Leuk Lymphoma* **46**, 347-55.
- Mahieux, R., Ibrahim, F., Mauclore, P., Herve, V., Michel, P., Tekaia, F., Chappey, C., Garin, B., Van Der Ryst, E., Guillemain, B. et al.** (1997). Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J Virol* **71**, 1317-33.
- Mahieux, R., Pise-Masison, C. A., Lambert, P. F., Nicot, C., De Marchis, L., Gessain, A., Green, P., Hall, W. and Brady, J. N.** (2000). Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *J Virol* **74**, 6866-74.
- Mahieux, R., Suspene, R., Delebecque, F., Henry, M., Schwartz, O., Wain-Hobson, S. and Vartanian, J. P.** (2005). Extensive editing of a small fraction of human T-cell leukemia virus type 1 genomes by four APOBEC3 cytidine deaminases. *J Gen Virol* **86**, 2489-94.
- Majone, F. and Jeang, K. T.** (2000). Clastogenic effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein correlates with unstabilized DNA breaks. *J Biol Chem* **275**, 32906-10.
- Majone, F., Luisetto, R., Zamboni, D., Iwanaga, Y. and Jeang, K. T.** (2005). Ku protein as a potential human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax target in clastogenic chromosomal instability of mammalian cells. *Retrovirology* **2**, 45.

- Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G. P., Fuller, S. D. and Bangham, C. R.** (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* **3**, e2251.
- Manel, N., Kim, F. J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M. and Battini, J. L.** (2003a). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**, 449-59.
- Manel, N., Kinet, S., Battini, J. L., Kim, F. J., Taylor, N. and Sitbon, M.** (2003b). The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis. *Blood* **101**, 1913-8.
- Manns, A., Wilks, R. J., Murphy, E. L., Haynes, G., Figueroa, J. P., Barnett, M., Hanchard, B. and Blattner, W. A.** (1992). A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer* **51**, 886-91.
- Mansky, L. M.** (2000). In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy. *J Virol* **74**, 9525-31.
- Mansky, L. M. and Gajary, L. C.** (2002). The primary nucleotide sequence of the bovine leukemia virus RNA packaging signal can influence efficient RNA packaging and virus replication. *Virology* **301**, 272-80.
- Mao, Y. S., Zhang, B. and Spector, D. L.** (2011). Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet* **27**, 295-306.
- Martin-Latil, S., Gnadig, N. F., Mallet, A., Desdouts, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M. C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S. et al.** (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood* **120**, 572-80.
- Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hatakeyama, M., Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J., Yoshida, M. and Taniguchi, T.** (1987). Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell* **48**, 343-50.
- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S. C., Tatham, M. H., Hay, R. T., Lamond, A. I., Mann, M. and Vertegaal, A. C.** (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* **7**, 132-44.
- Matsumoto, K., Shibata, H., Fujisawa, J. I., Inoue, H., Hakura, A., Tsukahara, T. and Fujii, M.** (1997). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J Virol* **71**, 4445-51.
- Matsuoka, M. and Jeang, K. T.** (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* **30**, 1379-89.
- Mattern, M. R., Wu, J. and Nicholson, B.** (2012). Ubiquitin-based anticancer therapy: Carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors. *Biochim Biophys Acta*.
- Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D.** (2006). HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* **346**, 194-204.
- McCool, K. W. and Miyamoto, S.** (2012). DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* **246**, 311-26.
- Meekings, K. N., Leipzig, J., Bushman, F. D., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2008). HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog* **4**, e1000027.
- Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A. and Mahieux, R.** (2004). A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J Biol Chem* **279**, 43307-20.
- Melikyan, G. B.** (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111.
- Metzger, M. B., Hristova, V. A. and Weissman, A. M.** (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* **125**, 531-7.

- Michael, N. L., Vahey, M. T., d'Arcy, L., Ehrenberg, P. K., Mosca, J. D., Rappaport, J. and Redfield, R. R.** (1994). Negative-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat. *J Virol* **68**, 979-87.
- Mihaylova, V. T., Green, A. M., Khurgel, M., Semmes, O. J. and Kupfer, G. M.** (2008). Human T-cell leukemia virus I tax protein sensitizes p53-mutant cells to DNA damage. *Cancer Res* **68**, 4843-52.
- Miller, F., Afonso, P. V., Gessain, A. and Ceccaldi, P. E.** (2012). Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence* **3**, 222-9.
- Milpied, P., Renand, A., Bruneau, J., Mendes-da-Cruz, D. A., Jacquelin, S., Asnafi, V., Rubio, M. T., MacIntyre, E., Lepelletier, Y. and Hermine, O.** (2009). Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* **39**, 1466-71.
- Mitra-Kaushik, S., Harding, J. C., Hess, J. L. and Ratner, L.** (2004). Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on tumor growth in HTLV-1 Tax transgenic mice and Tax tumor transplants. *Blood* **104**, 802-9.
- Miura, T., Fukunaga, T., Igarashi, T., Yamashita, M., Ido, E., Funahashi, S., Ishida, T., Washio, K., Ueda, S., Hashimoto, K. et al.** (1994). Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1124-7.
- Miyake, H., Suzuki, T., Hirai, H. and Yoshida, M.** (1999). Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome. *Virology* **253**, 155-61.
- Miyazaki, M., Yasunaga, J., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T. and Matsuoka, M.** (2007). Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* **81**, 5714-23.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K. and Sato, J.** (1980). A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann* **71**, 155-6.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S. and Shiraishi, Y.** (1981). A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gann* **72**, 978-81.
- Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujishita, M., Taguchi, H., Kubonishi, I., Niiya, K. and Minezawa, M.** (1982). Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet* **2**, 658.
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M. and Nakamura, M.** (2009). Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J Biol Chem* **284**, 25501-11.
- Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Tajima, K., Yoshimura, K., Nakashima, S., Shirao, M., Araki, S., Miyata, N., Mori, S. et al.** (1992). Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis* **166**, 943-4.
- Mocquet, V., Neusiedler, J., Rende, F., Cluet, D., Robin, J. P., Terme, J. M., Duc Dodon, M., Wittmann, J., Morris, C., Le Hir, H. et al.** (2012). The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J Virol* **86**, 7530-43.
- Morcock, D. R., Kane, B. P. and Casas-Finet, J. R.** (2000). Fluorescence and nucleic acid binding properties of the human T-cell leukemia virus-type 1 nucleocapsid protein. *Biochim Biophys Acta* **1481**, 381-94.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. and Gallo, R.** (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**, 1007-8.
- Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M. and Yamamoto, N.** (2001). Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes* **22**, 279-87.
- Mori, N., Fujii, M., Iwai, K., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Hata, T., Yamada, Y., Tanaka, Y., Tomonaga, M. and Yamamoto, N.** (2000). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **95**, 3915-21.

- Mori, N., Yamada, Y., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Tsukasaki, K., Tanaka, Y., Tomonaga, M., Yamamoto, N. and Fujii, M. (2002). Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **100**, 1828-34.
- Morimoto, C., Matsuyama, T., Oshige, C., Tanaka, H., Hercend, T., Reinherz, E. L. and Schlossman, S. F. (1985). Functional and phenotypic studies of Japanese adult T cell leukemia cells. *J Clin Invest* **75**, 836-43.
- Morimoto, H., Tsukada, J., Kominato, Y. and Tanaka, Y. (2005). Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia. *Am J Hematol* **78**, 100-7.
- Mulloy, J. C., Kislyakova, T., Cereseto, A., Casareto, L., LoMonico, A., Fullen, J., Lorenzi, M. V., Cara, A., Nicot, C., Giam, C. et al. (1998). Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J Virol* **72**, 8852-60.
- Murata, K., Hayashibara, T., Sugahara, K., Uemura, A., Yamaguchi, T., Harasawa, H., Hasegawa, H., Tsuruda, K., Okazaki, T., Koji, T. et al. (2006). A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol* **80**, 2495-505.
- Murphy, E. L., Fridey, J., Smith, J. W., Engstrom, J., Sacher, R. A., Miller, K., Gible, J., Stevens, J., Thomson, R., Hansma, D. et al. (1997). HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology* **48**, 315-20.
- Murphy, E. L., Wilks, R., Hanchard, B., Cranston, B., Figueroa, J. P., Gibbs, W. N., Murphy, J. and Blattner, W. A. (1996). A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *Int J Epidemiol* **25**, 1083-9.
- Nagai, M., Brennan, M. B., Sakai, J. A., Mora, C. A. and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* **98**, 1858-61.
- Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C. R., Izumo, S. et al. (1998). Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* **4**, 586-93.
- Nakagawa, M., Izumo, S., Ijichi, S., Kubota, H., Arimura, K., Kawabata, M. and Osame, M. (1995). HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* **1**, 50-61.
- Nakamura, S., Nagano, I., Yoshioka, M., Shimazaki, S., Onodera, J. and Kogure, K. (1993). Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* **42**, 127-30.
- Nakao, K., Ohba, N., Nakagawa, M. and Osame, M. (1999). Clinical course of HTLV-I-associated uveitis. *Jpn J Ophthalmol* **43**, 404-9.
- Nasr, R., Chiari, E., El-Sabban, M., Mahieux, R., Kfoury, Y., Abdulhay, M., Yazbeck, V., Hermine, O., de The, H., Pique, C. et al. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* **107**, 4021-9.
- Nasr, R., El-Sabban, M. E., Karam, J. A., Dbaiibo, G., Kfoury, Y., Arnulf, B., Lepelletier, Y., Bex, F., de The, H., Hermine, O. et al. (2005). Efficacy and mechanism of action of the proteasome inhibitor PS-341 in T-cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene* **24**, 419-30.
- Nasr, R., El Hajj, H., Kfoury, Y., de The, H., Hermine, O. and Bazarbachi, A. (2011). Controversies in targeted therapy of adult T cell leukemia/lymphoma: ON target or OFF target effects? *Viruses* **3**, 750-69.
- Nasr, R., Guillemain, M. C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo-Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V., Gournel, B. et al. (2008). Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med* **14**, 1333-42.
- Nath, M. D., Ruscetti, F. W., Petrow-Sadowski, C. and Jones, K. S. (2003). Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. *Blood* **101**, 3085-92.

- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., Konig, R., Yu, Q., Chiles, K. and Landau, N. R.** (2005). Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* **333**, 374-86.
- Ndhlovu, L. C., Snyder-Cappione, J. E., Carvalho, K. I., Leal, F. E., Loo, C. P., Bruno, F. R., Jha, A. R., Devita, D., Hasenkrug, A. M., Barbosa, H. M. et al.** (2009). Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. *Clin Exp Immunol* **158**, 294-9.
- Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* **280**, 29653-60.
- Neuveut, C., Low, K. G., Maldarelli, F., Schmitt, I., Majone, F., Grassmann, R. and Jeang, K. T.** (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb. *Mol Cell Biol* **18**, 3620-32.
- Ng, P. W., Iha, H., Iwanaga, Y., Bittner, M., Chen, Y., Jiang, Y., Gooden, G., Trent, J. M., Meltzer, P., Jeang, K. T. et al.** (2001). Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Oncogene* **20**, 4484-96.
- Nicholson, K. M. and Anderson, N. G.** (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**, 381-95.
- Nicot, C., Dunder, M., Johnson, J. M., Fullen, J. R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G. L., Derse, D., Misteli, T. and Franchini, G.** (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med* **10**, 197-201.
- Nicot, C. and Harrod, R.** (2000). Distinct p300-responsive mechanisms promote caspase-dependent apoptosis by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Mol Cell Biol* **20**, 8580-9.
- Nicot, C., Tie, F. and Giam, C. Z.** (1998). Cytoplasmic forms of human T-cell leukemia virus type 1 Tax induce NF-kappaB activation. *J Virol* **72**, 6777-84.
- Nitta, T., Kanai, M., Sugihara, E., Tanaka, M., Sun, B., Nagasawa, T., Sonoda, S., Saya, H. and Miwa, M.** (2006). Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells. *Cancer Sci* **97**, 836-41.
- Nyunoya, H., Akagi, T., Ogura, T., Maeda, S. and Shimotohno, K.** (1988). Evidence for phosphorylation of trans-activator p40x of human T-cell leukemia virus type I produced in insect cells with a baculovirus expression vector. *Virology* **167**, 538-44.
- Ohsugi, T. and Koito, A.** (2007). Human T cell leukemia virus type I is resistant to the antiviral effects of APOBEC3. *J Virol Methods* **139**, 93-6.
- Ohsugi, T., Kumasaka, T., Okada, S., Ishida, T., Yamaguchi, K., Horie, R., Watanabe, T. and Umezawa, K.** (2007). Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with tax-deficient adult T-cell leukemia-derived cell lines. *Cancer Lett* **257**, 206-15.
- Ohtsuki, Y., Akagi, T., Takahashi, K. and Miyoshi, I.** (1982). Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Arch Virol* **73**, 69-73.
- Okamura, J., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Uike, N., Sonoda, S., Kannagi, M., Tomonaga, M., Harada, M., Kimura, N., Masuda, M. et al.** (2005). Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **105**, 4143-5.
- Okochi, K., Sato, H. and Hinuma, Y.** (1984). A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang* **46**, 245-53.
- Ola, M. S., Nawaz, M. and Ahsan, H.** (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* **351**, 41-58.
- Oliere, S., Douville, R., Sze, A., Belgnaoui, S. M. and Hiscott, J.** (2011). Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **22**, 197-210.

- Oliere, S., Hernandez, E., Lezin, A., Arguello, M., Douville, R., Nguyen, T. L., Olindo, S., Panelatti, G., Kazanji, M., Wilkinson, P. et al. (2010). HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *PLoS Pathog* **6**, e1001177.
- Olindo, S., Belrose, G., Gillet, N., Rodriguez, S., Boxus, M., Verlaeten, O., Asquith, B., Bangham, C., Signate, A., Smadja, D. et al. (2011). Safety of long-term treatment of HAM/TSP patients with valproic acid. *Blood* **118**, 6306-9.
- Ono, A., Ikeda, E., Mochizuki, M., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Sawada, T., Yamane, S., Tokudome, S. and Watanabe, T. (1998). Provirus load in patients with human T-cell leukemia virus type 1 uveitis correlates with precedent Graves' disease and disease activities. *Jpn J Cancer Res* **89**, 608-14.
- Ooms, M., Krikoni, A., Kress, A. K., Simon, V. and Munk, C. (2012). APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1. *J Virol* **86**, 6097-108.
- Orland, J. R., Engstrom, J., Fridey, J., Sacher, R. A., Smith, J. W., Nass, C., Garratty, G., Newman, B., Smith, D., Wang, B. et al. (2003). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* **61**, 1588-94.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M. and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1**, 1031-2.
- Pais-Correia, A. M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A. and Thoulouze, M. I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* **16**, 83-9.
- Palmeri, D. and Malim, M. H. (1996). The human T-cell leukemia virus type 1 posttranscriptional trans-activator Rex contains a nuclear export signal. *J Virol* **70**, 6442-5.
- Park, H. U., Jeong, J. H., Chung, J. H. and Brady, J. N. (2004). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1. *Oncogene* **23**, 4966-74.
- Park, H. U., Jeong, S. J., Jeong, J. H., Chung, J. H. and Brady, J. N. (2006). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax attenuates gamma-irradiation-induced apoptosis through physical interaction with Chk2. *Oncogene* **25**, 438-47.
- Parker, C. E., Daenke, S., Nightingale, S. and Bangham, C. R. (1992). Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. *Virology* **188**, 628-36.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**, 3030-44.
- Peloponese, J. M., Jr., Haller, K., Miyazato, A. and Jeang, K. T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18974-9.
- Peloponese, J. M., Jr., Iha, H., Yedavalli, V. R., Miyazato, A., Li, Y., Haller, K., Benkirane, M. and Jeang, K. T. (2004). Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* **78**, 11686-95.
- Peloponese, J. M., Jr. and Jeang, K. T. (2006). Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J Biol Chem* **281**, 8927-38.
- Peloponese, J. M., Jr., Yasunaga, J., Kinjo, T., Watashi, K. and Jeang, K. T. (2009). Peptidylproline cis-trans-isomerase Pin1 interacts with human T-cell leukemia virus type 1 tax and modulates its activation of NF-kappaB. *J Virol* **83**, 3238-48.
- Pepin, N., Roulston, A., Lacoste, J., Lin, R. and Hiscott, J. (1994). Subcellular redistribution of HTLV-1 Tax protein by NF-kappa B/Rel transcription factors. *Virology* **204**, 706-16.
- Persaud, D., Munoz, J. L., Tarsis, S. L., Parks, E. S. and Parks, W. P. (1995). Time course and cytokine dependence of human T-cell lymphotropic virus type 1 T-lymphocyte transformation as revealed by a microtiter infectivity assay. *J Virol* **69**, 6297-303.
- Petropoulos, L. and Hiscott, J. (1998). Association between HTLV-1 Tax and I kappa B alpha is dependent on the I kappa B alpha phosphorylation state. *Virology* **252**, 189-99.

- Petropoulos, L., Lin, R. and Hiscott, J.** (1996). Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology* **225**, 52-64.
- Phillips, K. E., Herring, B., Wilson, L. A., Rickford, M. S., Zhang, M., Goldman, C. K., Tso, J. Y. and Waldmann, T. A.** (2000). IL-2Ralpha-Directed monoclonal antibodies provide effective therapy in a murine model of adult T-cell leukemia by a mechanism other than blockade of IL-2/IL-2Ralpha interaction. *Cancer Res* **60**, 6977-84.
- Pichler, K., Schneider, G. and Grassmann, R.** (2008). MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* **5**, 100.
- Piguet, V. and Sattentau, Q.** (2004). Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* **114**, 605-10.
- Pinon, J. D., Klasse, P. J., Jassal, S. R., Welson, S., Weber, J., Brighty, D. W. and Sattentau, Q. J.** (2003). Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* **77**, 9922-30.
- Pique, C., Ureta-Vidal, A., Gessain, A., Chancerel, B., Gout, O., Tamouza, R., Agis, F. and Dokhelar, M. C.** (2000). Evidence for the chronic in vivo production of human T cell leukemia virus type I Rof and Tof proteins from cytotoxic T lymphocytes directed against viral peptides. *J Exp Med* **191**, 567-72.
- Pise-Masison, C. A., Radonovich, M., Mahieux, R., Chatterjee, P., Whiteford, C., Duvall, J., Guillermin, C., Gessain, A. and Brady, J. N.** (2002). Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res* **62**, 3562-71.
- Platanias, L. C.** (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-86.
- Plechanovova, A., Jaffray, E. G., Tatham, M. H., Naismith, J. H. and Hay, R. T.** (2012). Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature*.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. and Gallo, R. C.** (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7415-9.
- Posner, L. E., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V. S., Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Fossieck, B., Bunn, P. A., Jr., Minna, J. D. and Gallo, R. C.** (1981). Natural antibodies to the human T cell lymphoma virus in patients with cutaneous T cell lymphomas. *J Exp Med* **154**, 333-46.
- Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B., Catalan-Soares, B. C. and Murphy, E. L.** (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* **24**, 6058-68.
- Pumfery, A., de la Fuente, C. and Kashanchi, F.** (2006). HTLV-1 Tax: centrosome amplification and cancer. *Retrovirology* **3**, 50.
- Qu, Z., Qing, G., Rabson, A. and Xiao, G.** (2004). Tax deregulation of NF-kappaB2 p100 processing involves both beta-TrCP-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **279**, 44563-72.
- Qu, Z. and Xiao, G.** (2011). Human T-cell lymphotropic virus: a model of NF-kappaB-associated tumorigenesis. *Viruses* **3**, 714-49.
- Ramirez, E., Cartier, L., Rodriguez, L., Alberti, C. and Valenzuela, M. A.** (2010). In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Res* **43**, 1109-15.
- Randles, L. and Walters, K. J.** (2012). Ubiquitin and its binding domains. *Front Biosci* **17**, 2140-57.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P. and Lopez, B. S.** (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother* **16**, 1-10.
- Rayne, F., Bouamr, F., Lalanne, J. and Mamoun, R. Z.** (2001). The NH2-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 capsid protein is involved in particle formation. *J Virol* **75**, 5277-87.

- Rayne, F., Kajava, A. V., Lalanne, J. and Mamoun, R. Z.** (2004). In vivo homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA gives clues to the retroviral capsid and TM envelope protein arrangement. *J Mol Biol* **343**, 903-16.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. and Sun, S. C.** (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* **25**, 3886-95.
- Reiley, W. W., Jin, W., Lee, A. J., Wright, A., Wu, X., Tewalt, E. F., Leonard, T. O., Norbury, C. C., Fitzpatrick, L., Zhang, M. et al.** (2007). Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med* **204**, 1475-85.
- Reitz, M. S., Jr., Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W. and Gallo, R. C.** (1981). Characterization and distribution of nucleic acid sequences of a novel type C retrovirus isolated from neoplastic human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1887-91.
- Rende, F., Cavallari, I., Corradin, A., Silic-Benussi, M., Toulza, F., Toffolo, G. M., Tanaka, Y., Jacobson, S., Taylor, G. P., D'Agostino, D. M. et al.** (2011). Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* **117**, 4855-9.
- Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P. and Dalgleish, A. G.** (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* **64**, 5682-7.
- Rivera-Walsh, I., Waterfield, M., Xiao, G., Fong, A. and Sun, S. C.** (2001). NF-kappaB signaling pathway governs TRAIL gene expression and human T-cell leukemia virus-I Tax-induced T-cell death. *J Biol Chem* **276**, 40385-8.
- Robek, M. D. and Ratner, L.** (1999). immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol* **73**, 4856-65.
- Robert-Guroff, M. and Gallo, R. C.** (1977). Serological analysis of cellular and viral DNA polymerases by an antiserum to DNA polymerase gamma of human lymphoblasts. *Biochemistry* **16**, 2874-80.
- Robert, M. S., Smith, R. G., Gallo, R. C., Sarin, P. S. and Abrell, J. W.** (1972). Viral and cellular DNA polymerase: comparison of activities with synthetic and natural RNA templates. *Science* **176**, 798-800.
- Rodriguez, S. M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sanchez-Alcaraz, M. T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutierrez, G., Trono, K., Alvarez, I. et al.** (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* **3**, 1210-48.
- Roman, G. C. and Osame, M.** (1988). Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet* **1**, 651.
- Romero, I. A., Prevost, M. C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P. O. and Ozden, S.** (2000). Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system. *J Virol* **74**, 6021-30.
- Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Ling, K. L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V. et al.** (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* **35**, 1681-91.
- Rosen, C. A., Sodroski, J. G., Willems, L., Kettmann, R., Campbell, K., Zaya, R., Burny, A. and Haseltine, W. A.** (1986). The 3' region of bovine leukemia virus genome encodes a trans-activator protein. *Embo J* **5**, 2585-9.
- Rosenberg, A. R., Delamarre, L., Pique, C., Le Blanc, I., Griffith, G. and Dokhelar, M. C.** (1999). Early assembly step of a retroviral envelope glycoprotein: analysis using a dominant negative assay. *J Cell Biol* **145**, 57-68.
- Rosenblatt, J. D., Cann, A. J., Slamon, D. J., Smalberg, I. S., Shah, N. P., Fujii, J., Wachsman, W. and Chen, I. S.** (1988). HTLV-II transactivation is regulated by the overlapping tax/rex nonstructural genes. *Science* **240**, 916-9.

- Rosin, O., Koch, C., Schmitt, I., Semmes, O. J., Jeang, K. T. and Grassmann, R.** (1998). A human T-cell leukemia virus Tax variant incapable of activating NF-kappaB retains its immortalizing potential for primary T-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 6698-703.
- Roucoux, D. F. and Murphy, E. L.** (2004). The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* **6**, 144-54.
- Rous, P.** (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **13**, 397-411.
- Rous, P. and Beard, J. W.** (1935). The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope). *J Exp Med* **62**, 523-48.
- Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F. and Jalinot, P.** (1996). Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* **381**, 328-31.
- Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F. and Jalinot, P.** (1998). The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene* **16**, 643-54.
- Ruben, S., Poteat, H., Tan, T. H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W. and Rosen, C. A.** (1988). Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. *Science* **241**, 89-92.
- Saggioro, D.** (2011). Anti-apoptotic effect of Tax: an NF-kappaB path or a CREB way? *Viruses* **3**, 1001-14.
- Saggioro, D., Barp, S. and Chieco-Bianchi, L.** (2001). Block of a mitochondrial-mediated apoptotic pathway in Tax-expressing murine fibroblasts. *Exp Cell Res* **269**, 245-55.
- Saggioro, D., Majone, F., Forino, M., Turchetto, L., Leszl, A. and Chieco-Bianchi, L.** (1994). Tax protein of human T-lymphotropic virus type I triggers DNA damage. *Leuk Lymphoma* **12**, 281-6.
- Saito, K., Saito, M., Taniura, N., Okuwa, T. and Ohara, Y.** (2010). Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology* **403**, 173-80.
- Saksena, N. K., Sherman, M. P., Yanagihara, R., Dube, D. K. and Poiesz, B. J.** (1992). LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. *Virology* **189**, 1-9.
- Salemi, M., Lewis, M., Egan, J. F., Hall, W. W., Desmyter, J. and Vandamme, A. M.** (1999a). Different population dynamics of human T cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13253-8.
- Salemi, M., Vandamme, A. M., Desmyter, J., Casoli, C. and Bertazzoni, U.** (1999b). The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) and the relationship with its replication strategy. *Gene* **234**, 11-21.
- Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R. and Okamoto, T.** (2006). Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Leukemia* **20**, 590-8.
- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N. and Kashanchi, F.** (1999). Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J Virol* **73**, 9917-27.
- Sasada, A., Takaori-Kondo, A., Shirakawa, K., Kobayashi, M., Abudu, A., Hishizawa, M., Imada, K., Tanaka, Y. and Uchiyama, T.** (2005). APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2**, 32.
- Satou, Y., Nosaka, K., Koya, Y., Yasunaga, J. I., Toyokuni, S. and Matsuoka, M.** (2004). Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. *Leukemia* **18**, 1357-63.
- Satou, Y., Utsunomiya, A., Tanabe, J., Nakagawa, M., Nosaka, K. and Matsuoka, M.** (2012). HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* **9**, 46.

- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M. and Matsuoka, M.** (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 720-5.
- Schavinsky-Khrapunsky, Y., Priel, E. and Aboud, M.** (2008). Dose-dependent dual effect of HTLV-1 tax oncoprotein on p53-dependent nucleotide excision repair in human T-cells. *Int J Cancer* **122**, 305-16.
- Schmukle, A. C. and Walczak, H.** (2012). No one can whistle a symphony alone - how different ubiquitin linkages cooperate to orchestrate NF-kappaB activity. *J Cell Sci* **125**, 549-59.
- Seiki, M., Inoue, J., Hidaka, M. and Yoshida, M.** (1988). Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7124-8.
- Seiki, M., Inoue, J., Takeda, T. and Yoshida, M.** (1986). Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. *Embo J* **5**, 561-5.
- Semmes, O. J. and Jeang, K. T.** (1992a). HTLV-I Tax is a zinc-binding protein: role of zinc in Tax structure and function. *Virology* **188**, 754-64.
- Semmes, O. J. and Jeang, K. T.** (1992b). Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type I Tax: regions necessary for function determined with 47 mutant proteins. *J Virol* **66**, 7183-92.
- Semmes, O. J. and Jeang, K. T.** (1995). Definition of a minimal activation domain in human T-cell leukemia virus type I Tax. *J Virol* **69**, 1827-33.
- Semmes, O. J. and Jeang, K. T.** (1996). Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol* **70**, 6347-57.
- Semmes, O. J., Majone, F., Cantemir, C., Turchetto, L., Hjelle, B. and Jeang, K. T.** (1996). HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs. *Virology* **217**, 373-9.
- Sheehy, N., Lillis, L., Watters, K., Lewis, M., Gautier, V. and Hall, W.** (2006). Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins. *Retrovirology* **3**, 20.
- Shembade, N., Harhaj, N. S., Parvatiyar, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Matesic, L. E. and Harhaj, E. W.** (2008). The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol* **9**, 254-62.
- Shembade, N., Harhaj, N. S., Yamamoto, M., Akira, S. and Harhaj, E. W.** (2007). The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol* **81**, 13735-42.
- Shembade, N., Ma, A. and Harhaj, E. W.** (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* **327**, 1135-9.
- Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N. S., Abbott, D. W. and Harhaj, E. W.** (2011). The kinase IKKalpha inhibits activation of the transcription factor NF-kappaB by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat Immunol* **12**, 834-43.
- Shibata, Y., Tanaka, Y., Gohda, J. and Inoue, J.** (2011). Activation of the IkappaB kinase complex by HTLV-1 Tax requires cytosolic factors involved in Tax-induced polyubiquitination. *J Biochem* **150**, 679-86.
- Shimoyama, M.** (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* **79**, 428-37.
- Shinzato, O., Ikeda, S., Momita, S., Nagata, Y., Kamihira, S., Nakayama, E. and Shiku, H.** (1991). Semiquantitative analysis of integrated genomes of human T-lymphotropic virus type I in asymptomatic virus carriers. *Blood* **78**, 2082-8.
- Shoji, T., Higuchi, M., Kondo, R., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Aoyagi, Y. and Fujii, M.** (2009). Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology* **6**, 83.
- Shuh, M. and Derse, D.** (2000). Ternary complex factors and cofactors are essential for human T-cell leukemia virus type 1 tax transactivation of the serum response element. *J Virol* **74**, 11394-7.

- Siekevitz, M., Feinberg, M. B., Holbrook, N., Wong-Staal, F. and Greene, W. C. (1987).** Activation of interleukin 2 and interleukin 2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus, type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5389-93.
- Simonis, N., Rual, J. F., Lemmens, I., Boxus, M., Hirozane-Kishikawa, T., Gatot, J. S., Dricot, A., Hao, T., Vertommen, D., Legros, S. et al. (2012).** Host-pathogen interactome mapping for HTLV-1 and -2 retroviruses. *Retrovirology* **9**, 26.
- Sinha-Datta, U., Datta, A., Ghorbel, S., Dodon, M. D. and Nicot, C. (2007).** Human T-cell lymphotropic virus type I rex and p30 interactions govern the switch between virus latency and replication. *J Biol Chem* **282**, 14608-15.
- Siu, Y. T., Chin, K. T., Siu, K. L., Yee Wai Choy, E., Jeang, K. T. and Jin, D. Y. (2006).** TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J Virol* **80**, 7052-9.
- Skaug, B., Jiang, X. and Chen, Z. J. (2009).** The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* **78**, 769-96.
- Slattery, J. P., Franchini, G. and Gessain, A. (1999).** Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res* **9**, 525-40.
- Smith, M. R. and Greene, W. C. (1990).** Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* **4**, 1875-85.
- Smith, M. R. and Greene, W. C. (1992).** Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* **187**, 316-20.
- Song, H. Y., Rothe, M. and Goeddel, D. V. (1996).** The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAFF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6721-5.
- Spector, D. L. and Lamond, A. I. (2011).** Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Stewart, S. A., Feuer, G., Jewett, A., Lee, F. V., Bonavida, B. and Chen, I. S. (1996).** HTLV-1 gene expression in adult T-cell leukemia cells elicits an NK cell response in vitro and correlates with cell rejection in SCID mice. *Virology* **226**, 167-75.
- Suemori, K., Fujiwara, H., Ochi, T., Ogawa, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Mesnard, J. M. and Yasukawa, M. (2009).** HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* **90**, 1806-11.
- Sullivan, M. T., Williams, A. E., Fang, C. T., Grandinetti, T., Poiesz, B. J. and Ehrlich, G. D. (1991).** Transmission of human T-lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. A retrospective study of recipients of blood components (1983 through 1988). The American Red Cross HTLV-I/II Collaborative Study Group. *Arch Intern Med* **151**, 2043-8.
- Sun, S. C., Elwood, J., Beraud, C. and Greene, W. C. (1994).** Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF-kappa B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol Cell Biol* **14**, 7377-84.
- Sun, S. C., Harhaj, E. W., Xiao, G. and Good, L. (2000).** Activation of I-kappaB kinase by the HTLV type 1 Tax protein: mechanistic insights into the adaptor function of IKKgamma. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1591-6.
- Sun, S. C. and Yamaoka, S. (2005).** Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* **24**, 5952-64.
- Suzuki, S., Singhirunnusorn, P., Mori, A., Yamaoka, S., Kitajima, I., Saiki, I. and Sakurai, H. (2007).** Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2 but not IKK-NF-kappaB. *J Biol Chem* **282**, 25177-81.
- Suzuki, S., Zhou, Y., Refaat, A., Takasaki, I., Koizumi, K., Yamaoka, S., Tabuchi, Y., Saiki, I. and Sakurai, H. (2010).** Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. *J Biol Chem* **285**, 4441-6.

- Suzuki, T., Hirai, H., Fujisawa, J., Fujita, T. and Yoshida, M.** (1993). A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CARG box. *Oncogene* **8**, 2391-7.
- Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T. and Yoshida, M.** (1995). Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* **10**, 1199-207.
- Suzuki, T., Hirai, H. and Yoshida, M.** (1994). Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* **9**, 3099-105.
- Suzuki, T., Kitao, S., Matsushime, H. and Yoshida, M.** (1996). HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *Embo J* **15**, 1607-14.
- Suzuki, T., Narita, T., Uchida-Toita, M. and Yoshida, M.** (1999a). Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms. *Virology* **259**, 384-91.
- Suzuki, T., Ohsugi, Y., Uchida-Toita, M., Akiyama, T. and Yoshida, M.** (1999b). Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene* **18**, 5967-72.
- Switzer, W. M., Salemi, M., Qari, S. H., Jia, H., Gray, R. R., Katzourakis, A., Marriott, S. J., Pryor, K. N., Wolfe, N. D., Burke, D. S. et al.** (2009). Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. *Retrovirology* **6**, 9.
- Szymocha, R., Akaoka, H., Brisson, C., Beurton-Marduel, P., Chalon, A., Bernard, A., Didier-Bazes, M., Belin, M. F. and Giraudon, P.** (2000a). Astrocytic alterations induced by HTLV type 1-infected T lymphocytes: a role for Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1723-9.
- Szymocha, R., Brisson, C., Bernard, A., Akaoka, H., Belin, M. F. and Giraudon, P.** (2000b). Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *J Neurovirol* **6**, 350-7.
- Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E., Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y. et al.** (2007). Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. *J Virol* **81**, 5908-18.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J., Nosaka, K., Tanaka, Y. and Matsuoka, M.** (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* **109**, 559-67.
- Tamiya, S., Matsuoka, M., Etoh, K., Watanabe, T., Kamihira, S., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K.** (1996). Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* **88**, 3065-73.
- Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M. and Hatanaka, M.** (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1071-5.
- Tanaka, G., Okayama, A., Watanabe, T., Aizawa, S., Stuver, S., Mueller, N., Hsieh, C. C. and Tsubouchi, H.** (2005). The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J Infect Dis* **191**, 1140-7.
- Tatham, M. H., Geoffroy, M. C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E. G., Palvimo, J. J. and Hay, R. T.** (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* **10**, 538-46.
- Taylor, G. P., Goon, P., Furukawa, Y., Green, H., Barfield, A., Mosley, A., Nose, H., Babiker, A., Rudge, P., Usuku, K. et al.** (2006). Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology* **3**, 63.

- Taylor, J. M., Brown, M., Nejmeddine, M., Kim, K. J., Ratner, L., Lairmore, M. and Nicot, C.** (2009). Novel role for interleukin-2 receptor-Jak signaling in retrovirus transmission. *J Virol* **83**, 11467-76.
- Taylor, J. M. and Nicot, C.** (2008). HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* **13**, 733-47.
- Temin, H. M. and Mizutani, S.** (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-3.
- Terme, J. M., Mocquet, V., Kuhlmann, A. S., Zane, L., Mortreux, F., Wattel, E., Duc Dodon, M. and Jalinot, P.** (2009). Inhibition of the hTERT promoter by the proto-oncogenic protein TAL1. *Leukemia* **23**, 2081-9.
- Thebault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. and Mesnard, J. M.** (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **562**, 165-70.
- Tie, F., Adya, N., Greene, W. C. and Giam, C. Z.** (1996). Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. *J Virol* **70**, 8368-74.
- Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A. et al.** (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* **179**, 5082-9.
- Tosi, G., Pilotti, E., Mortara, L., De Lerma Barbaro, A., Casoli, C. and Accolla, R. S.** (2006). Inhibition of human T cell leukemia virus type 2 replication by the suppressive action of class II transactivator and nuclear factor Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12861-6.
- Toufaily, C., Landry, S., Leib-Mosch, C., Rassart, E. and Barbeau, B.** (2011). Activation of LTRs from different human endogenous retrovirus (HERV) families by the HTLV-1 tax protein and T-cell activators. *Viruses* **3**, 2146-59.
- Toulza, F., Heaps, A., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2008). High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood* **111**, 5047-53.
- Toulza, F., Nosaka, K., Takiguchi, M., Pagliuca, T., Mitsuya, H., Tanaka, Y., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2009). FoxP3+ regulatory T cells are distinct from leukemia cells in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia. *Int J Cancer* **125**, 2375-82.
- Toulza, F., Nosaka, K., Tanaka, Y., Schioppa, T., Balkwill, F., Taylor, G. P. and Bangham, C. R.** (2010). Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* **185**, 183-9.
- Toyoshima, H., Itoh, M., Inoue, J., Seiki, M., Takaku, F. and Yoshida, M.** (1990). Secondary structure of the human T-cell leukemia virus type 1 rex-responsive element is essential for rex regulation of RNA processing and transport of unspliced RNAs. *J Virol* **64**, 2825-32.
- Trempe, J. F.** (2011). Reading the ubiquitin postal code. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 792-801.
- Trevisan, R., Daprai, L., Acquasaliente, L., Ciminale, V., Chieco-Bianchi, L. and Saggioro, D.** (2004). Relevance of CREB phosphorylation in the anti-apoptotic function of human T-lymphotropic virus type 1 tax protein in serum-deprived murine fibroblasts. *Exp Cell Res* **299**, 57-67.
- Trevisan, R., Daprai, L., Paloschi, L., Vajente, N., Chieco-Bianchi, L. and Saggioro, D.** (2006). Antiapoptotic effect of human T-cell leukemia virus type 1 tax protein correlates with its creb transcriptional activity. *Exp Cell Res* **312**, 1390-400.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G.** (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* **424**, 793-6.
- Tsubata, C., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Gejyo, F. and Fujii, M.** (2005). PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line. *Retrovirology* **2**, 46.
- Tsuiji, T., Sheehy, N., Gautier, V. W., Hayakawa, H., Sawa, H. and Hall, W. W.** (2007). The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is carrier- and energy-independent. *J Biol Chem* **282**, 13875-83.

- Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J. C., Harrington, W., Jr., O'Mahony, D., Janik, J. E., Bittencourt, A. L., Taylor, G. P. et al.** (2009). Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* **27**, 453-9.
- Turci, M., Lodewick, J., Righi, P., Polania, A., Romanelli, M. G., Bex, F. and Bertazzoni, U.** (2009). HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax. *Virology* **386**, 6-11.
- Turci, M., Romanelli, M. G., Lorenzi, P., Righi, P. and Bertazzoni, U.** (2006). Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is dependent upon a nuclear localization determinant in the N-terminal region. *Gene* **365**, 119-24.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. and Uchino, H.** (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**, 481-92.
- Ueda, M., Imada, K., Imura, A., Koga, H., Hishizawa, M. and Uchiyama, T.** (2005). Expression of functional interleukin-21 receptor on adult T-cell leukaemia cells. *Br J Haematol* **128**, 169-76.
- Uhlir, M., Good, L., Xiao, G., Harhaj, E. W., Zandi, E., Karin, M. and Sun, S. C.** (1998). NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T-cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **273**, 21132-6.
- Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A. T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E. and Osame, M.** (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 424-30.
- Vajente, N., Trevisan, R. and Saggioro, D.** (2009). HTLV-1 Tax protein cooperates with Ras in protecting cells from apoptosis. *Apoptosis* **14**, 153-63.
- Vallabhapurapu, S. and Karin, M.** (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* **27**, 693-733.
- Van Brussel, M., Salemi, M., Liu, H. F., Gabriels, J., Goubau, P., Desmyter, J. and Vandamme, A. M.** (1998). The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from Pan paniscus is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization. *Virology* **243**, 366-79.
- van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L.** (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* **81**, 323-57.
- Van Dooren, S., Salemi, M. and Vandamme, A. M.** (2001). Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I) subtypes. *Mol Biol Evol* **18**, 661-71.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D. and Franchini, G.** (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20738-43.
- Vandamme, A. M., Bertazzoni, U. and Salemi, M.** (2000). Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. *Gene* **261**, 171-80.
- Vandamme, A. M., Salemi, M. and Desmyter, J.** (1998). The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol* **6**, 477-83.
- Verdonck, K., Gonzalez, E., Van Dooren, S., Vandamme, A. M., Vanham, G. and Gotuzzo, E.** (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* **7**, 266-81.
- Vertegaal, A. C.** (2011). Uncovering ubiquitin and ubiquitin-like signaling networks. *Chem Rev* **111**, 7923-40.
- Virdee, S., Kapadnis, P. B., Elliott, T., Lang, K., Madrzak, J., Nguyen, D. P., Riechmann, L. and Chin, J. W.** (2011). Traceless and site-specific ubiquitination of recombinant proteins. *J Am Chem Soc* **133**, 10708-11.
- Vitte, A. L., Buchsbaum, S. and Jalinot, P.** (2006). Modulation of HIV-1 Rev protein abundance and activity by polyubiquitination with unconventional Lys-33 branching. *FEBS Lett* **580**, 6155-60.
- Wagner, S. and Green, M. R.** (1993). HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science* **262**, 395-9.

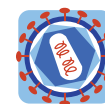
- Waldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B. R. and Grassmann, R.** (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* **107**, 4491-9.
- Wang, H., Machesky, N. J. and Mansky, L. M.** (2004). Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release. *J Virol* **78**, 1503-12.
- Wang, T. G., Ye, J., Lairmore, M. D. and Green, P. L.** (2000). In vitro cellular tropism of human T cell leukemia virus type 2. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1661-8.
- Wang, X., Herr, R. A. and Hansen, T. H.** (2012). Ubiquitination of substrates by esterification. *Traffic* **13**, 19-24.
- Ward, C. L., Omura, S. and Kopito, R. R.** (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-7.
- Watanabe, M., Ohsugi, T., Shoda, M., Ishida, T., Aizawa, S., Maruyama-Nagai, M., Utsunomiya, A., Koga, S., Yamada, Y., Kamihira, S. et al.** (2005). Dual targeting of transformed and untransformed HTLV-1-infected T cells by DHMEQ, a potent and selective inhibitor of NF-kappaB, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult T-cell leukemia. *Blood* **106**, 2462-71.
- Watanabe, T., Seiki, M., Hirayama, Y. and Yoshida, M.** (1986). Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* **148**, 385-8.
- Watanabe, T., Seiki, M., Tsujimoto, H., Miyoshi, I., Hayami, M. and Yoshida, M.** (1985). Sequence homology of the simian retrovirus genome with human T-cell leukemia virus type I. *Virology* **144**, 59-65.
- Watanabe, T., Seiki, M. and Yoshida, M.** (1984). HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology* **133**, 238-41.
- Wattel, E., Vartanian, J. P., Pannetier, C. and Wain-Hobson, S.** (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* **69**, 2863-8.
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L. et al.** (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430**, 694-9.
- Whang-Peng, J., Bunn, P. A., Knutsen, T., Kao-Shan, C. S., Broder, S., Jaffe, E. S., Gelmann, E., Blattner, W., Lofters, W., Young, R. C. et al.** (1985). Cytogenetic studies in human T-cell lymphoma virus (HTLV)-positive leukemia-lymphoma in the United States. *J Natl Cancer Inst* **74**, 357-69.
- Wiktor, S. Z., Pate, E. J., Rosenberg, P. S., Barnett, M., Palmer, P., Medeiros, D., Maloney, E. M. and Blattner, W. A.** (1997). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J Hum Virol* **1**, 37-44.
- Wilkinson, K. A. and Henley, J. M.** (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* **428**, 133-45.
- Winter, H. Y., Dayaram, T. and Marriott, S. J.** (2007). Activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat by the ternary complex factor Elk-1. *J Virol* **81**, 13075-81.
- Winter, H. Y. and Marriott, S. J.** (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J Virol* **81**, 6089-98.
- Wolfe, N. D., Heneine, W., Carr, J. K., Garcia, A. D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J. N., Prosser, A. T., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E. et al.** (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7994-9.
- Wright, A., Reiley, W. W., Chang, M., Jin, W., Lee, A. J., Zhang, M. and Sun, S. C.** (2007). Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Dev Cell* **13**, 705-16.
- Wu, K., Bottazzi, M. E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S. D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A. et al.** (2004). Protein profile of tax-associated complexes. *J Biol Chem* **279**, 495-508.
- Wu, X. and Sun, S. C.** (2007). Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep* **8**, 510-5.

- Wu, X., Zhang, M. and Sun, S. C.** (2011). Mutual regulation between deubiquitinase CYLD and retroviral oncoprotein Tax. *Cell Biosci* **1**, 27.
- Wycuff, D. R., Yanites, H. L. and Marriott, S. J.** (2004). Identification of a functional serum response element in the HTLV-I LTR. *Virology* **324**, 540-53.
- Xia, Z. P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W. and Chen, Z. J.** (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* **461**, 114-9.
- Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M. and Sun, S. C.** (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *Embo J* **20**, 6805-15.
- Xiao, G. and Fu, J.** (2011). NF-kappaB and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res* **1**, 192-221.
- Xiao, G., Harhaj, E. W. and Sun, S. C.** (2000). Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK) regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J Biol Chem* **275**, 34060-7.
- Xie, L. and Green, P. L.** (2005). Envelope is a major viral determinant of the distinct in vitro cellular transformation tropism of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *J Virol* **79**, 14536-45.
- Xie, L., Yamamoto, B., Haoudi, A., Semmes, O. J. and Green, P. L.** (2006). PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. *Blood* **107**, 1980-8.
- Xu, X., Heidenreich, O., Kitajima, I., McGuire, K., Li, Q., Su, B. and Nerenberg, M.** (1996). Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* **13**, 135-42.
- Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto, Y. and Hatanaka, M.** (1994). The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the Bcl-2 protein. *J Virol* **68**, 3374-9.
- Yamaguchi, K. and Watanabe, T.** (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol* **76 Suppl 2**, 240-5.
- Yamamoto, K., Ishida, T., Nakano, K., Yamagishi, M., Yamochi, T., Tanaka, Y., Furukawa, Y., Nakamura, Y. and Watanabe, T.** (2011). SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci* **102**, 260-6.
- Yamamoto, N., Okada, M., Koyanagi, Y., Kannagi, M. and Hinuma, Y.** (1982). Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science* **217**, 737-9.
- Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., Yagishita, N. et al.** (2009). Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* **4**, e6517.
- Yamano, Y., Cohen, C. J., Takenouchi, N., Yao, K., Tomaru, U., Li, H. C., Reiter, Y. and Jacobson, S.** (2004). Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J Exp Med* **199**, 1367-77.
- Yamano, Y., Nagai, M., Brennan, M., Mora, C. A., Soldan, S. S., Tomaru, U., Takenouchi, N., Izumo, S., Osame, M. and Jacobson, S.** (2002). Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* **99**, 88-94.
- Yamano, Y., Takenouchi, N., Li, H. C., Tomaru, U., Yao, K., Grant, C. W., Maric, D. A. and Jacobson, S.** (2005). Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest* **115**, 1361-8.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J. and Israel, A.** (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231-40.

- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T. and Hatanaka, M.** (1996). Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *Embo J* **15**, 873-87.
- Yan, P., Fu, J., Qu, Z., Li, S., Tanaka, T., Grusby, M. J. and Xiao, G.** (2009a). PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* **113**, 4370-80.
- Yan, P., Qu, Z., Ishikawa, C., Mori, N. and Xiao, G.** (2009b). Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia* **11**, 1036-41.
- Yanagihara, R., Saitou, N., Nerurkar, V. R., Song, K. J., Bastian, I., Franchini, G. and Gajdusek, D. C.** (1995). Molecular phylogeny and dissemination of human T-cell lymphotropic virus type I viewed within the context of primate evolution and human migration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41 Suppl 1**, S145-61.
- Yang, L., Kotomura, N., Ho, Y. K., Zhi, H., Bixler, S., Schell, M. J. and Giam, C. Z.** (2011). Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J Virol* **85**, 3001-9.
- Yano, H., Ishida, T., Inagaki, A., Ishii, T., Kusumoto, S., Komatsu, H., Iida, S., Utsunomiya, A. and Ueda, R.** (2007). Regulatory T-cell function of adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Int J Cancer* **120**, 2052-7.
- Yasunaga, J., Lin, F. C., Lu, X. and Jeang, K. T.** (2011). Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF-kappaB signaling. *J Virol* **85**, 6212-9.
- Yasunaga, J., Sakai, T., Nosaka, K., Etoh, K., Tamiya, S., Koga, S., Mita, S., Uchino, M., Mitsuya, H. and Matsuoka, M.** (2001). Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood* **97**, 3177-83.
- Ye, H., Park, Y. C., Kreishman, M., Kieff, E. and Wu, H.** (1999). The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* **4**, 321-30.
- Ye, J., Xie, L. and Green, P. L.** (2003). Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. *J Virol* **77**, 7728-35.
- Yin, M. J., Christerson, L. B., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M. H. and Gaynor, R. B.** (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 875-84.
- Yin, M. J., Paulsen, E. J., Seeler, J. S. and Gaynor, R. B.** (1995). Protein domains involved in both in vivo and in vitro interactions between human T-cell leukemia virus type I tax and CREB. *J Virol* **69**, 3420-32.
- Yin, Y., Seifert, A., Chua, J. S., Maure, J. F., Golebiowski, F. and Hay, R. T.** (2012). SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase RNF4 is required for the response of human cells to DNA damage. *Genes Dev* **26**, 1196-208.
- Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y.** (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2031-5.
- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J., Fujisawa, J. and Matsuoka, M.** (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol* **82**, 9359-68.
- Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K.** (1984). Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2534-7.
- Yoshie, O., Fujisawa, R., Nakayama, T., Harasawa, H., Tago, H., Izawa, D., Hieshima, K., Tatsumi, Y., Matsushima, K., Hasegawa, H. et al.** (2002). Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* **99**, 1505-11.

- Yoshita, M., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y. and Fujii, M.** (2012). Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci* **103**, 369-74.
- Yu, F., Itoyama, Y., Fujihara, K. and Goto, I.** (1991). Natural killer (NK) cells in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-decrease in NK cell subset populations and activity in HTLV-I seropositive individuals. *J Neuroimmunol* **33**, 121-8.
- Yu, Q., Minoda, Y., Yoshida, R., Yoshida, H., Iha, H., Kobayashi, T., Yoshimura, A. and Takaesu, G.** (2008). HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 189-94.
- Zane, L., Sibon, D., Capraro, V., Galia, P., Karam, M., Delfau-Larue, M. H., Gilson, E., Gessain, A., Gout, O., Hermine, O. et al.** (2012). HTLV-1 positive and negative T cells cloned from infected individuals display telomerase and telomere genes deregulation that predominate in activated but untransformed CD4+ T cells. *Int J Cancer* **131**, 821-33.
- Zhang, J., Yamada, O., Kawagishi, K., Araki, H., Yamaoka, S., Hattori, T. and Shimotohno, K.** (2008). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology* **379**, 306-13.
- Zhang, W., Nisbet, J. W., Albrecht, B., Ding, W., Kashanchi, F., Bartoe, J. T. and Lairmore, M. D.** (2001). Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J Virol* **75**, 9885-95.
- Zhang, W., Nisbet, J. W., Bartoe, J. T., Ding, W. and Lairmore, M. D.** (2000). Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) functions as a transcription factor and differentially modulates CREB-responsive promoters. *J Virol* **74**, 11270-7.
- Zhao, L. J. and Giam, C. Z.** (1992). Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7070-4.
- Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M. and Matsuoka, M.** (2009). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* **113**, 2755-64.
- Zheng, H., Wolfe, N. D., Sintasath, D. M., Tamoufe, U., Lebreton, M., Djoko, C. F., Dikko, J. E., Pike, B. L., Heneine, W. and Switzer, W. M.** (2010). Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology* **401**, 137-45.
- Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y. L., Ho, Y. K., Shih, H. M. and Giam, C. Z.** (2011). NF-kappaB hyperactivation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog* **7**, e1002025.
- Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R. and Brady, J. N.** (2006). Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J Virol* **80**, 4781-91.
- Zimmerman, B., Niewiesk, S. and Lairmore, M. D.** (2010). Mouse models of human T lymphotropic virus type-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Vet Pathol* **47**, 677-89.
- Zotti, T., Vito, P. and Stilo, R.** (2012). The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol* **227**, 1280-4.

ANNEXES



RESEARCH

Open Access

Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation

Amandine Bonnet^{1,2,3}, Voahangy Randrianarison-Huetz^{1,2,3}, Patrycja Nzounza^{1,2,3}, Martine Nedelec^{1,2,3}, Maxime Chazal^{1,2,3}, Laetitia Waast^{1,2,3}, Sabrina Pene^{1,2,3}, Ali Bazarbachi⁴, Renaud Mahieux⁵, Laurence Bénit^{1,2,3} and Claudine Pique^{1,2,3*}

Abstract

Background: The Tax protein encoded by Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a powerful activator of the NF- κ B pathway, a property critical for HTLV-1-induced immortalization of CD4⁺ T lymphocytes. Tax permanently stimulates this pathway at a cytoplasmic level by activating the I κ B kinase (IKK) complex and at a nuclear level by enhancing the binding of the NF- κ B factor RelA to its cognate promoters and by forming nuclear bodies, believed to represent transcriptionally active structures. In previous studies, we reported that Tax ubiquitination and SUMOylation play a critical role in Tax localization and NF- κ B activation. Indeed, analysis of lysine Tax mutants fused or not to ubiquitin or SUMO led us to propose a two-step model in which Tax ubiquitination first intervenes to activate IKK while Tax SUMOylation is subsequently required for promoter activation within Tax nuclear bodies. However, recent studies showing that ubiquitin or SUMO can modulate Tax activities in either the nucleus or the cytoplasm and that SUMOylated Tax can serve as substrate for ubiquitination suggested that Tax ubiquitination and SUMOylation may mediate redundant rather than successive functions.

Results: In this study, we analyzed the properties of a new Tax mutant that is properly ubiquitinated, but defective for both nuclear body formation and SUMOylation. We report that reducing Tax SUMOylation and nuclear body formation do not alter the ability of Tax to activate IKK, induce RelA nuclear translocation, and trigger gene expression from a NF- κ B promoter. Importantly, potent NF- κ B promoter activation by Tax despite low SUMOylation and nuclear body formation is also observed in T cells, including CD4⁺ primary T lymphocytes. Moreover, we show that Tax nuclear bodies are hardly observed in HTLV-1-infected T cells. Finally, we provide direct evidence that the degree of NF- κ B activation by Tax correlates with the level of Tax ubiquitination, but not SUMOylation.

Conclusions: These data reveal that the formation of Tax nuclear bodies, previously associated to transcriptional activities in Tax-transfected cells, is dispensable for NF- κ B promoter activation, notably in CD4⁺ T cells. They also provide the first evidence that Tax SUMOylation is not a key determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

Keywords: Retrovirus, Leukemia, NF-kappaB, Ubiquitin, SUMO, Nuclear speckles

* Correspondence: claudine.pique@inserm.fr

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

²CNRS, UMR8104, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the agent of Adult T-cell Leukemia, a fatal hematopoietic malignancy due to the transformation of CD4⁺ T lymphocytes. The Tax regulatory viral protein plays a pivotal role in HTLV-1-induced T-cell transformation. Indeed, Tax triggers permanent T cell proliferation through a variety of mechanisms including promotion of cell cycle, deregulation of apoptosis and activation or repression of cellular gene promoters (reviewed in [1-4]). Notably, Tax is a powerful inducer of the NF- κ B pathway, an activity shown to be required for HTLV-1-induced immortalization of primary CD4⁺ T lymphocytes [5].

In physiological conditions, the NF- κ B pathway is transiently activated in response to extracellular stimuli (reviewed in [6]). These results in the activation of the cytoplasmic I κ B kinase (IKK) complex, which consists of two catalytic subunits, IKK α and IKK β and a regulatory subunit, NF- κ B essential modulator (NEMO)/IKK γ . Once activated, IKK induces the phosphorylation and degradation of the NF- κ B inhibitors I κ B, liberating the NF- κ B factors which then translocate to the nucleus. Contrasting with the physiological situation, Tax is able to activate the NF- κ B pathway in a permanent manner by acting on both the cytoplasmic and nuclear phases. In the cytoplasm, Tax binds to NEMO [7] and recruits adaptor proteins and kinases that in turn promote IKK α/β activation ([8-11] and reviewed in [12]). In the nucleus, Tax binds to and stabilizes the binding of NF- κ B factors, including RelA/p65, to the NF- κ B dependent promoter [13,14]. In the nucleus, Tax also assembles into particular structures called Tax nuclear speckled structures or Tax nuclear bodies [15-17]. This was shown to depend upon the presence of an N-terminal region located between residues 50 to 75 of Tax (Tax speckled structure localization signal, TSLS) [18]. NF- κ B-mediated transcription may arise in these structures, since they contain components of the NF- κ B pathway such as p50, RelA/p65 and NEMO [16,19,20]. In addition, repression of cellular promoters was also associated with Tax nuclear bodies [21]. Tax nuclear bodies also contain components of splicing complexes [17] and DNA damage response machineries [22] and were, therefore, proposed to mediate other functions than transcription (reviewed in [23]).

In previous studies, we and others demonstrated that Tax is ubiquitinated and SUMOylated [20,24-26]. A series of studies focusing on the role of Tax ubiquitination demonstrated the critical role of this modification in NF- κ B activation. Indeed, reducing or increasing Tax ubiquitination by interfering with ubiquitination or deubiquitination enzymes was shown to block or enhance Tax-induced NF- κ B activation, respectively [27-30]. NF- κ B activation was associated with Tax conjugation to

K63-linked ubiquitin chains, which were shown to be essential for Tax binding to NEMO and IKK activation [30-32]. K63-linked ubiquitin chains also promote the targeting of Tax and NEMO to perinuclear spots associated to the centrosome and the Golgi apparatus, believed to represent a Tax-induced cytoplasmic signaling platform [32,33]. Tax SUMOylation was initially associated with nuclear events. Indeed, SUMO-1-conjugated Tax subpopulations were found in the nucleus and coexpressing Tax along with SUMO-1 was shown to increase the nuclear fraction of Tax. Moreover, SUMO-1 was found to colocalize with Tax in nuclear bodies [19,20,24].

Tax possesses 10 lysine residues (referred to as K1 to K10), among those K4 to K8 serve as targets for ubiquitination and K6 to K8 as targets for SUMOylation (Figure 1). We and others previously showed that mutating lysines K4 to K8 abolishes both Tax ubiquitination and SUMOylation and renders Tax inactive for RelA nuclear translocation, a defect restored by making a Tax ubiquitin fusion protein. Mutating only lysines among K6 to K8 still allows RelA nuclear translocation, but strongly reduces NF- κ B promoter activation, which is partially restored upon fusion to SUMO-1 [20,24]. These findings led to the proposition of a two-step working model in which K63 ubiquitination of Tax first intervenes in the cytoplasm to activate IKK and allows RelA nuclear translocation, while Tax SUMOylation is subsequently required for RelA-dependent promoter activation within Tax nuclear bodies. However, subsequent observations suggest a more complex picture. Indeed, it was reported that mono-ubiquitination in the nucleus activates the nucleocytoplasmic shuttling of Tax in stress conditions [34]. Moreover, fusing lysine Tax mutants to SUMO-1 was shown to enhance NEMO targeting to cytoplasmic perinuclear spots while fusing them to ubiquitin was shown to restore the formation of nuclear bodies [19]. In addition, RNF4, an ubiquitin ligase that preferentially ubiquitinates SUMOylated substrates, was recently reported to be involved in Tax ubiquitination [27]. These recent findings favor the notion that Tax ubiquitination and SUMOylation may mediate redundant rather than successive functions.

How Tax post-translational modifications and their impact on Tax localization are synchronized with NF- κ B activation is still unclear. Moreover, the importance of Tax post-translational modifications and nuclear bodies has not been investigated in CD4⁺ T cells yet. In this study, we revisited the role of Tax nuclear bodies and Tax SUMOylation on Tax activities. We confirm that Tax SUMOylation correlates with the formation of Tax nuclear bodies. We also demonstrate that, surprisingly, impaired nuclear body formation still allows Tax to fully activate a NF- κ B promoter in either cell lines or primary CD4⁺ T cells. In addition, we provide evidence that the

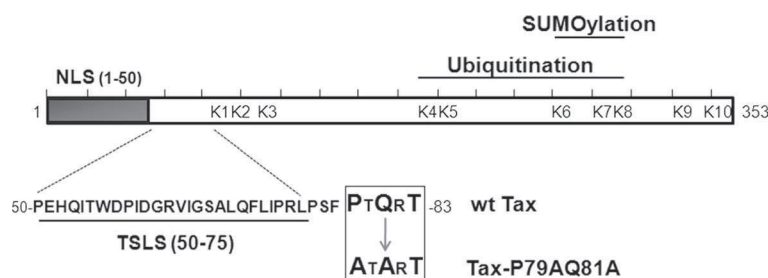


Figure 1 Description of the Tax-P79AQ81A mutant. Schematic representation of the primary amino-acid sequence of Tax showing the N-terminal nuclear localization signal (NLS, amino-acids 1–50), the Tax speckled structure localization signal (TSLs, amino-acids 50–75) and the potential TRAF-binding motif (boxed) in which alanine substitutions were introduced (Tax-P79AQ81A mutant). The lysine residues targeted by ubiquitination and SUMOylation are also indicated.

degree of Tax NF- κ B activity correlates with the level of Tax ubiquitination but not SUMOylation. These data provide the first direct evidence that Tax nuclear body formation and Tax SUMOylation are dispensable for Tax-induced NF- κ B activation.

Results

Tax-P79AQ81A, a Tax mutant defective for nuclear body formation

In the search for potential functional motifs in Tax, we selected a PxQxT sequence (aa 79–83) because this sequence fits with a putative motif for binding to the TRAFs (TNF-receptor associated factor), which are ubiquitin ligases acting in the NF- κ B pathway [35]. Interestingly, the PxQxT motif is also just adjacent to the TSLs (Figure 1), suggesting that it might be involved in the nucleocytoplasmic trafficking of Tax. It was previously shown that residues at position 1 and 3 of the PxQxT motif are the most critical for binding to the TRAFs [36]. Hence, a mutant in which the P79 and Q81 residues were changed to alanines (Tax-P79AQ81A, Figure 1) was generated to study the role of the PxQxT motif in Tax modifications and activities.

The subcellular localization of wild-type (wt) Tax and Tax-P79AQ81A was first compared in HeLa cells (Figure 2A). As previously described [24], wt Tax was detected both in the cytoplasm and in the nucleus, where it formed well visible nuclear bodies (NB) (67% of the cells). A dramatic change in nuclear localization was found for Tax-P79AQ81A since Tax-P79AQ81A was present in the nucleus as diffuse staining in all transfected cells, and very few and very small nuclear bodies were detected in only 8% of the cells while 92% of Tax positive cells did not show any nuclear bodies (Figure 2A). A dramatic reduction in nuclear body formation by Tax-P79AQ81A was also found in transfected 293 T cells and more importantly, in transfected CEM T cells (less than 10% of the cells, Figure 2B and 2C).

Hence, mutations of the P79 and Q81 residues do not alter the nuclear import of Tax, but preclude Tax nuclear

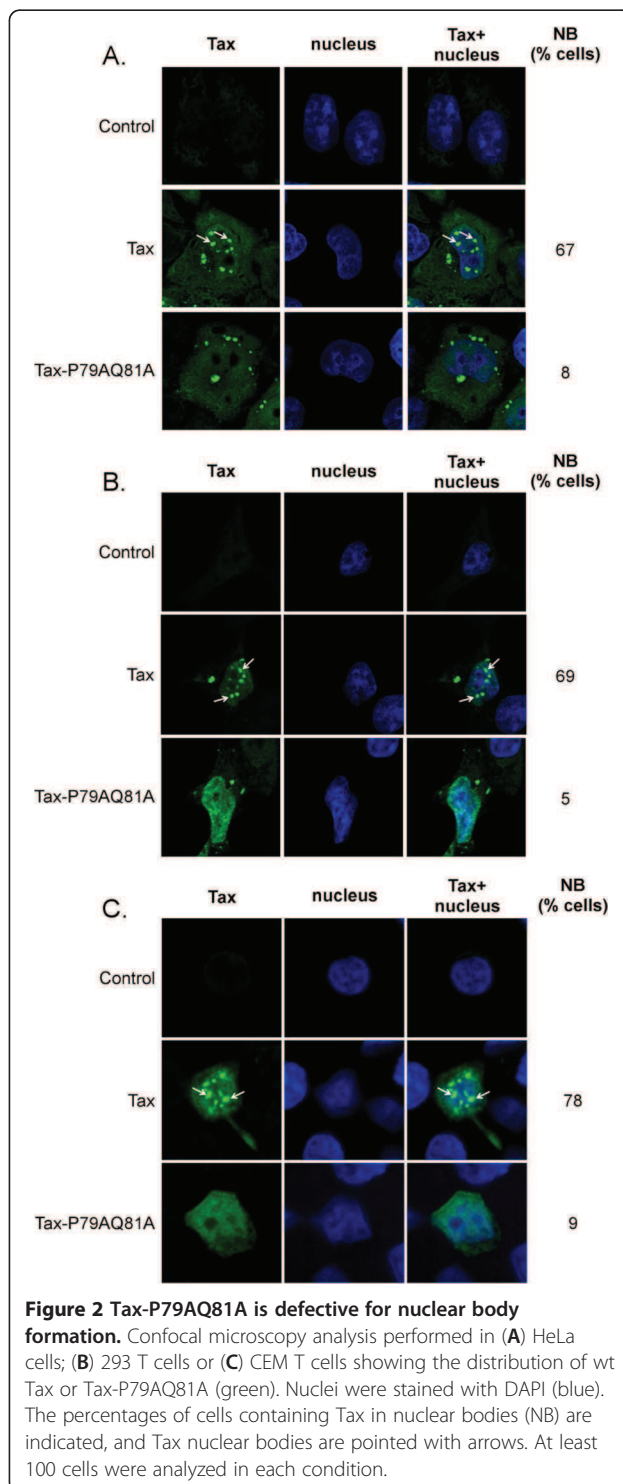
body formation. This confirms the importance of the TSLs-containing N-terminal region of Tax in nuclear body formation and suggests that the P79 and Q81 residues are part of this nuclear body targeting signal.

Tax-P79AQ81A properly activates the cytoplasmic steps of the NF- κ B pathway

In the cytoplasm, Tax binds to NEMO and activates the IKK complex, a process that requires the targeting of both Tax and IKK to perinuclear spots (PS) [32,33]. In immunoprecipitation assays, we confirmed that wt Tax coprecipitated endogenous NEMO and induced the phosphorylation of IKK α / β (Figure 3A, lane 2). Tax-P79AQ81A also properly coprecipitated with endogenous NEMO and induced the phosphorylation of IKK α / β (Figure 3A, lane 3). In contrast, and as expected from earlier data [7], neither NEMO binding nor IKK activation was observed for the NF- κ B-defective M22 mutant (Figure 3A, lane 4).

A cell fractionation procedure described for the purification of cytoplasmic aggresomes, which are centrosomal-associated insoluble structures containing ubiquitinated proteins [37], was used next to study Tax and NEMO targeting to perinuclear spots. Comparable amounts of wt Tax and Tax-P79AQ81A were found in the insoluble fractions, indicating that both proteins were similarly targeted to cytoplasmic aggresomes (Figure 3B, Tax panel, lanes 5 and 6). Similar enrichment of NEMO was observed in the insoluble fraction of cells expressing either wt Tax or Tax-P79AQ81A (Figure 3B, NEMO panel, lanes 5 and 6), as compared to mock transfected cells (lane 4), indicating that both Tax proteins were equally efficient to relocate NEMO to cytoplasmic aggresomes.

Confocal microscopy experiments further showed that endogenous NEMO was targeted to perinuclear spots in almost 100% of Tax-positive cells regardless of whether the cells had they produced wt Tax or Tax-P79AQ81A (Figure 3C). Wt Tax was also concentrated in perinuclear spots in 76% of cells as compared to 49% of Tax-P79AQ81A-expressing cells (Figure 3C). Of note, this



difference was due to the reduction of the cell population containing Tax-P79AQ81A in both perinuclear spots and nuclear bodies while the proportion of cells containing Tax only in perinuclear spots was comparable between Tax-P79AQ81A and wt Tax (Additional file 1: Figure S1).

Since the final consequence of IKK activation is the nuclear translocation of RelA, we analyzed the localization of endogenous RelA in Tax-expressing cells (Figure 3D). While RelA was found in the cytoplasm of Tax-negative cells, it was clearly relocated to the nucleus in the totality of cells expressing either wt Tax or Tax-P79AQ81A. Interestingly, the pattern of RelA mirrored that of Tax since while RelA was found in nuclear bodies in cells producing wt Tax, it was detected as a diffuse staining in cells producing Tax-P79AQ81A (Figure 3D).

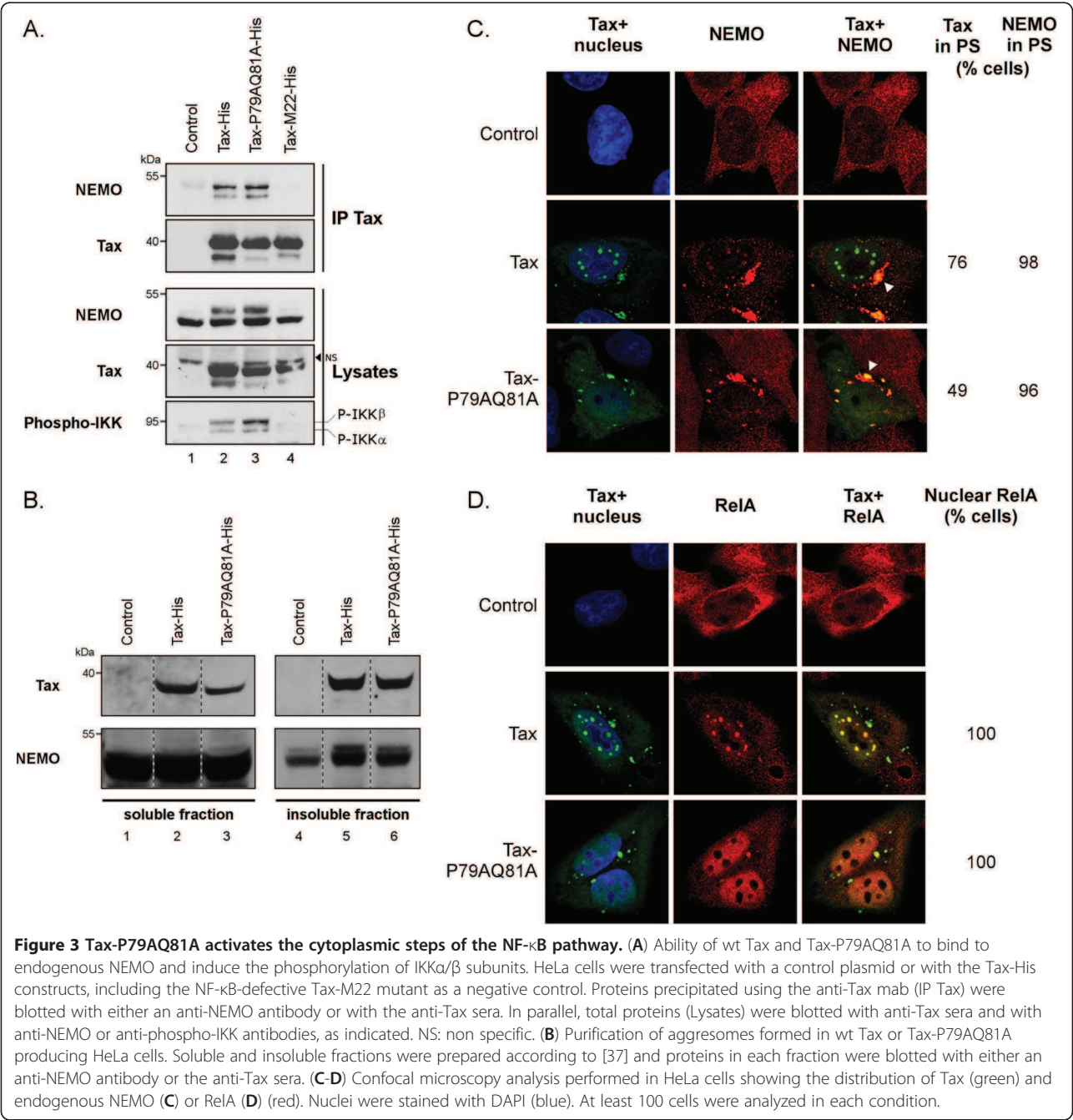
These results demonstrate that Tax-P79AQ81A properly activates the cytoplasmic steps of the NF- κ B pathway and induces nuclear RelA translocation in absence of nuclear body formation.

Tax-P79AQ81A is as active as wt Tax for NF- κ B promoter activation

Nuclear body formation was proposed to facilitate activation of the NF- κ B pathway at the nuclear level. Whether Tax-P79AQ81A is able to drive gene expression from a NF- κ B promoter was, therefore, investigated. NF- κ B reporter gene assays performed in HeLa (Figure 4A) and 293 T cells (Figure 4B) showed no significant difference ($p > 0.05$) between the NF- κ B promoter transactivation levels of wt Tax and Tax-P79AQ81A. The same experiments were performed in T cells, including the CEM T cell line (Figure 4C) and primary CD4⁺ T cells (Figure 4D). In both T cell systems, Tax-P79AQ81A was also fully able to transactivate the NF- κ B promoter. Furthermore, Tax-P79AQ81A transactivated a CREB promoter similarly to wt Tax in all cell types, confirming that the protein was functional (Additional file 2: Figure S2A-D). In all reporter gene assays, Tax-M22, defective for NF- κ B activation and Tax-M47, defective for CREB activation, were included as controls. Hence, while it is unable to form nuclear bodies, Tax-P79AQ81A is fully active in term of NF- κ B promoter activation in both adherent cells and T cells, including primary CD4⁺ T cells.

Tax nuclear bodies are hardly detected in HTLV-1-infected T cells

The previous findings, suggesting that absence of nuclear bodies did not alter Tax-induced NF- κ B activation, prompted us to investigate the status of nuclear bodies in HTLV-1-infected T cells. Confocal microscopy experiments were performed in two HTLV-1-infected T cell lines, C8166 cells that contain defective HTLV-1 proviruses still allowing Tax production [38] and HUT-102 cells, which contain wt proviruses and produce viral particles [39]. To facilitate the observation of Tax-positive cells, C8166 and HUT-102 cells were first mixed with uninfected CEM T cells, giving therefore the background



signal. Strikingly, while we used the same procedure that allows easy detection of nuclear bodies in transfected T cells, Tax nuclear bodies were found in less than 8% of the two HTLV-1-infected T cells (Figure 5). Importantly, NEMO-enriched perinuclear spots were clearly visible in both C8166 and HUT-102 cells (Figure 5, arrow heads), indicating IKK relocalization by endogenous Tax. Moreover, high luciferase production was detected upon transfection of the pNF- κ B-luciferase reporter plasmid in these cells (data not shown).

These results show that Tax, endogenously produced in HTLV-1-infected T cells, does not form nuclear bodies, although it is fully able to activate the NF- κ B pathway.

Tax-induced NF- κ B promoter activation correlates with the level of Tax ubiquitination but not the level of Tax SUMOylation

Since Tax nuclear bodies were previously linked to Tax SUMOylation, we analyzed the post-translational modifications of Tax-P79AQ81A. Purification of wt Tax

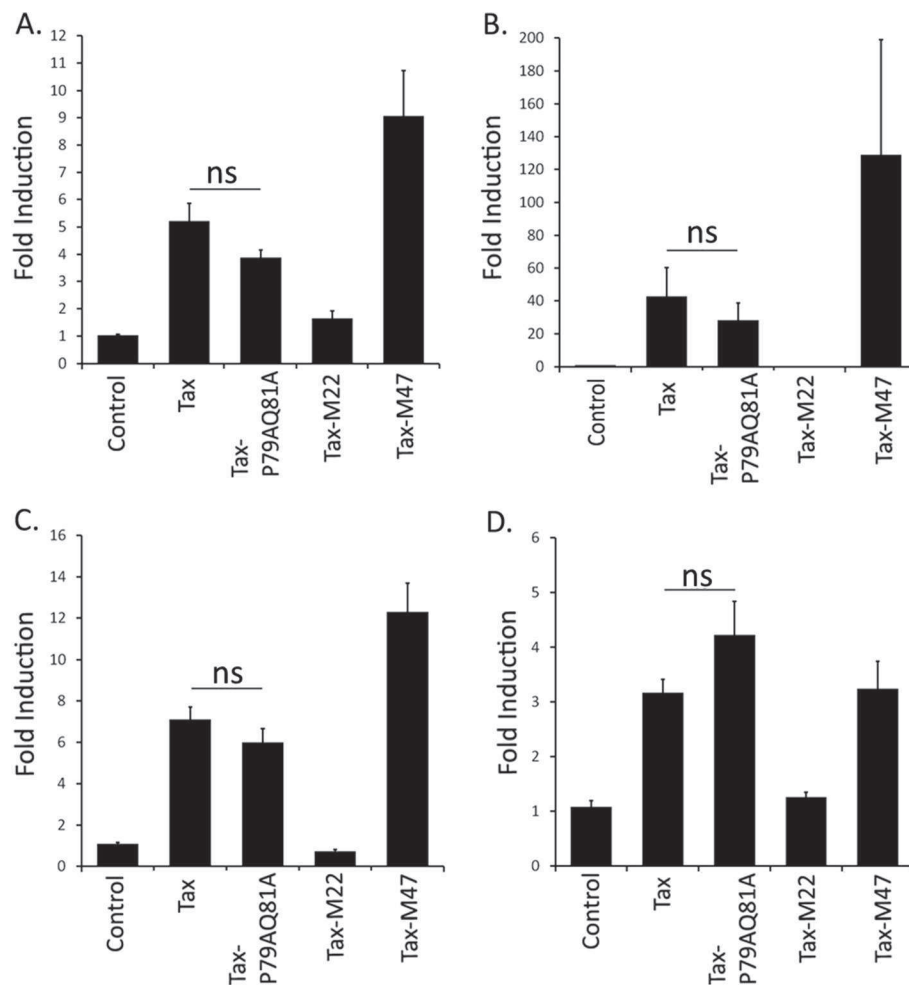


Figure 4 Tax-P79AQ81A properly activates a NF- κ B promoter in either cell lines or primary CD4⁺ T cells. NF- κ B promoter activity in Tax-transfected HeLa cells (A), 293 T cells (B), CEM T cells (C), and primary CD4⁺ T cells (D). Cells were transfected with a control plasmid or with the Tax-His constructs along with the NF- κ B reporter plasmid and the Renilla luciferase expression plasmid for normalization. To validate the experiments, the M22 (defective for the NF- κ B pathway) and M47 (defective for the CREB pathway) mutants were included in each experiment. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the firefly/renilla ratio obtained with the control plasmid. The results represent the means and standard error of the means (SEM) from at least four independent experiments performed in duplicates. ns: not statistically significant.

and the mutant was performed in a highly denaturant guanidine-containing buffer in order to avoid co-purification of non-covalently bound partners. Blotting the purified proteins with a pool of sera from HTLV-1-infected individuals revealed comparable amounts of modified Tax products between wt Tax and Tax-P79AQ81A (39% and 49% of total Tax respectively, Figure 6A).

The conjugation of wt Tax and Tax-P79AQ81A to either endogenous ubiquitin or SUMO was next examined. Wt Tax and Tax-P79AQ81A were conjugated to endogenous ubiquitin (Figure 6B) and more importantly to endogenous K63-linked ubiquitin chains (Figure 6C) at similar levels. Considering that K63-linked ubiquitin chains were shown to be critical for Tax interaction with NEMO, these results are consistent with our data

showing that Tax-P79AQ81A binds to NEMO like wt Tax. Contrasting with the level of ubiquitination, Tax-P79AQ81A displayed a severe reduction (78%) in conjugation to endogenous SUMO compared to wt Tax (Figure 6D). This reduction of SUMOylation was confirmed by experiments in which Tax or Tax-P79AQ81A was expressed together with a HA-SUMO-1 construct (Figure 6E). In all the pulldown experiments, wt Tax and Tax-P79AQ81A were expressed and purified at similar levels (Figure 6A-E, Tax panel). Hence, Tax-P79AQ81A is properly ubiquitinated, in particular with K63-linked ubiquitin chains, but is barely SUMOylated. Nevertheless, this mutant is fully able to transactivate a NF- κ B promoter, suggesting that SUMOylation is not essential for Tax-induced NF- κ B activation.

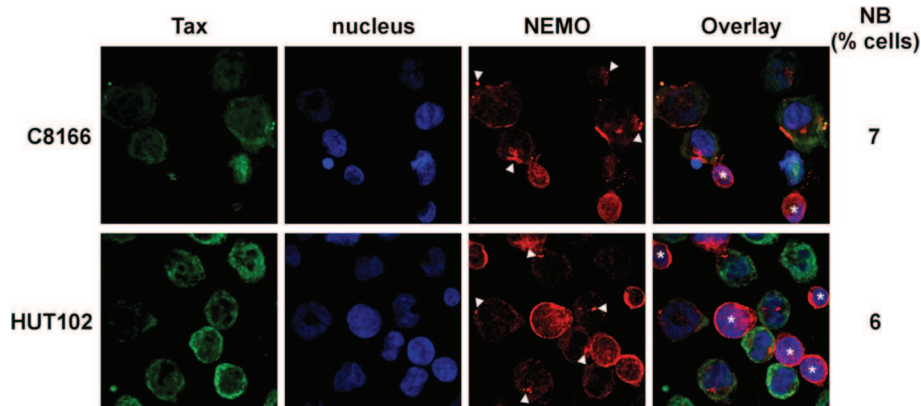


Figure 5 Tax nuclear bodies are not detected in HTLV-1-infected T cell lines. Confocal microscopy analysis performed with the HTLV-1-infected cell lines C8166 and HUT-102 showing the distribution of endogenous Tax (green) or NEMO (red). Nuclei were labeled with DAPI (blue). C8166 or HUT-102 cells were mixed with HTLV-1-negative CEM T cells as an internal negative control (indicated by asterisks). Perinuclear clusters of NEMO in Tax-positive cells are pointed with arrow heads, and the percentages of cells containing Tax in nuclear bodies (NB) are indicated. At least 200 cells were analyzed in each condition.

To further analyze the relationship between Tax SUMOylation and NF- κ B promoter activation, the properties of Tax-P79AQ81A were compared to those of the previously described lysine Tax mutants [24]. NiNTA pulldowns were performed in 293 T cells, in which protein expression is higher than in HeLa cells, ensuring fine quantification. Similarly to what we found in HeLa cells, Tax-P79AQ81A was properly ubiquitinated but barely SUMOylated in 293 T cells (Figure 7A). The lysine Tax mutants displayed the previously identified phenotypes: defect in both ubiquitination and SUMOylation (Tax-K1-10R, Tax-K4-8R), reduced ubiquitination and lack of SUMOylation (Tax-K6-8R, Tax-K7-8R) and low SUMOylation with only a slight reduction in ubiquitination (K7R) (Figure 7A). Interestingly, this latter pattern is very similar to that of Tax-P79AQ81A. In agreement with our previous studies [24], strong impact of lysine mutations on NF- κ B activity of Tax was observed (Figure 7B, upper panel). Tax-K6-8R and Tax-K7-8R showed low NF- κ B activity (Figure 7B) but wt level of CREB promoter activation (Additional file 2: Figure S2E), confirming their specific defect in NF- κ B activation. NF- κ B reporter gene assays further showed only a slight reduction in the NF- κ B activity of Tax-K7R (Figure 7B), which mirrored its slight reduction in ubiquitination (Figure 7A). Furthermore, when the levels of modifications for each mutant were plotted against the level of NF- κ B activities, a linear relation was clearly observed between Tax-induced NF- κ B promoter activation and Tax ubiquitination ($R^2 = 0.94$) but not Tax SUMOylation ($R^2 = 0.73$) (Figure 7C).

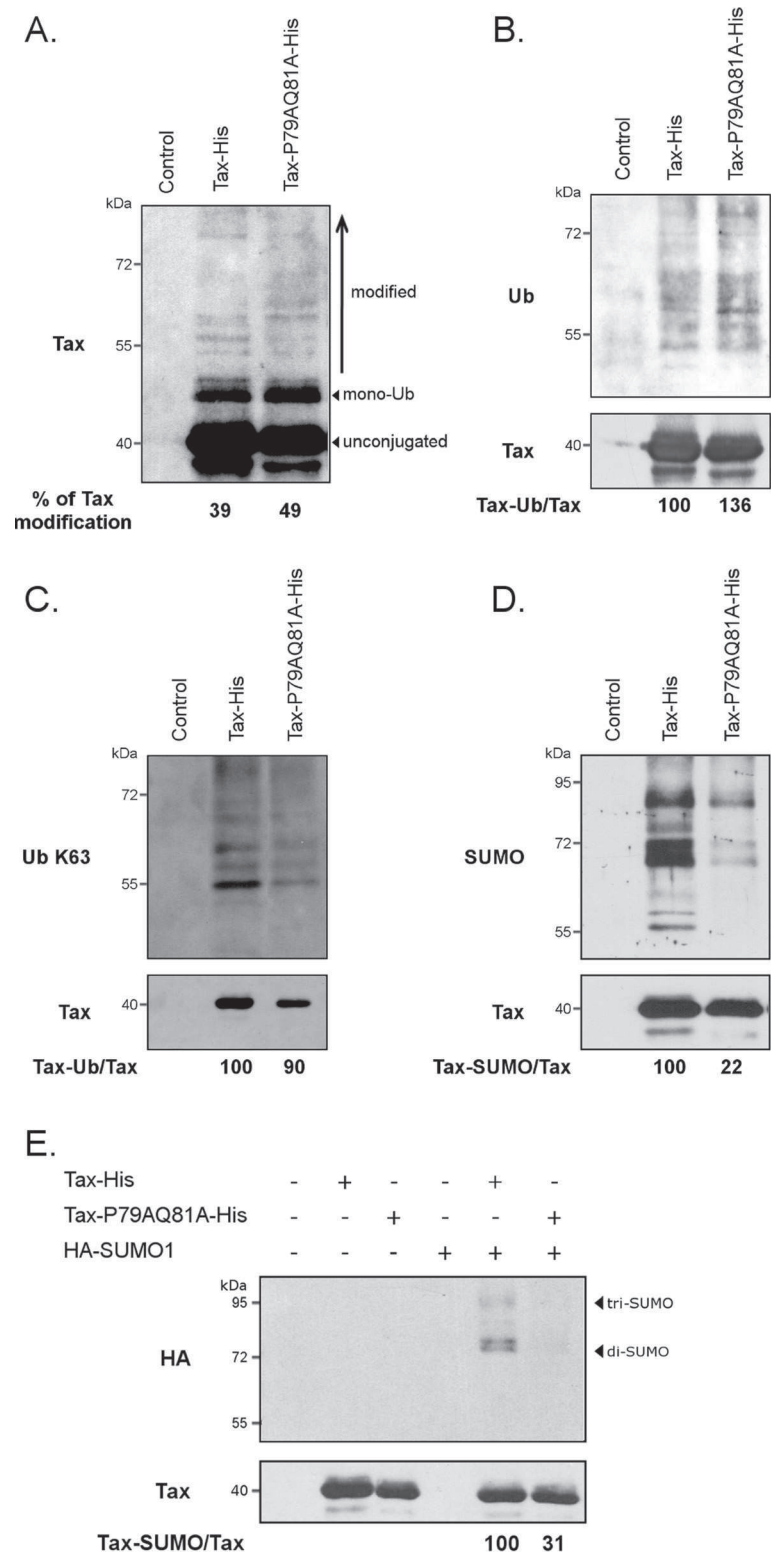
Tax ubiquitination is believed to govern Tax binding to NEMO and thereby, IKK activation. Indeed, non-conjugable lysine Tax mutants fail to bind to NEMO

[24], and the same defect is observed upon silencing of Ubc13, the ubiquitin conjugating enzyme shown to mediate Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains [30]. We further assessed the role of Tax ubiquitination on NEMO binding by analyzing the ability of the mutants used above to bind to either endogenous NEMO or endogenous phospho-IKK α/β (Figure 7D). Like for NF- κ B promoter activation, a linear relation was found between the amount of phospho-IKK associated to Tax and Tax ubiquitination ($R^2 = 0.94$) but not SUMOylation ($R^2 = 0.58$) (Figure 7E). These results provide direct evidence that ubiquitinated Tax is the species that binds to IKK and triggers IKK activation.

Altogether these data demonstrate that low SUMOylation does not prevent Tax-induced NF- κ B activation and that Tax ubiquitination is the predominant determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

Fusion of SUMO-1 increases the ubiquitination of Tax-P79AQ81A

We previously reported that fusing SUMO-1 to certain lysine Tax mutants partially rescued their ability to form nuclear bodies [24]. We thus wondered whether fusion of SUMO-1 to Tax-P79AQ81A could restore its nuclear body localization. Fusion of SUMO-1 to wt Tax increased the proportion of cells containing Tax nuclear bodies, as previously described [20,24] (98% of total NB (NB and NB + PS) for Tax-SUMO-1 as compared to 67% for non-fused Tax). A higher proportion of cells containing nuclear bodies was also observed upon SUMO-1 fusion to Tax-P79AQ81A (69% for Tax-P79AQ81A-SUMO-1, as compared to 8% for Tax-P79AQ81A). However, these nuclear bodies were less numerous (usually 2 to 3 per nucleus) than in the case of wt Tax and were



(See figure on previous page.)

Figure 6 Tax-P79AQ81A is defective for SUMOylation. NiNTA experiments performed in HeLa cells showing the total level of Tax modifications (A), or the amounts of Tax products conjugated to endogenous total ubiquitin (B), endogenous K63-linked ubiquitin chains (C), endogenous SUMO (D) or overexpressed HA-SUMO-1 (E) for either wt Tax and Tax-P79AQ81A. (A-D) HeLa cells were transfected with a control plasmid or each of the Tax-His constructs and in (E) along with a HA-SUMO-1 construct. Tax proteins purified using nickel columns were revealed with anti-Tax sera or with anti-Ubiquitin, anti-K63-linked ubiquitin chains, anti-SUMO-2/3 or anti-HA antibodies, as indicated. The percentage of Tax modification was calculated by dividing the amount of high molecular weight Tax products by the amount of total Tax (modified + unconjugated). The percentages of ubiquitinated or SUMOylated Tax were normalized on the amount of unconjugated Tax (Tax-Ub/Tax) and expressed in comparison to wt Tax (100%).

much smaller than those formed by wt Tax (Figure 8A). Moreover, the recruitment of RelA within these small nuclear bodies were only seen in 11% of nuclear bodies-containing cells, showing that fusion of SUMO-1 did not allow the formation of nuclear bodies with wild-type phenotype (Figure 8A). Confocal experiments also showed that fusion of SUMO-1 slightly decreased the number of cells containing Tax in perinuclear spots, an effect observed for both wt Tax (63% of Tax-SUMO-1 expressing cells as compared to 77% of wt Tax expressing cells) and Tax-P79AQ81A (33% of Tax-P79AQ81A-SUMO-1 expressing cells as compared to 51% of Tax-P79AQ81A expressing cells). Moreover, an increased cytosolic staining was observed for both wt Tax-SUMO-1 and Tax-P79AQ81A-SUMO-1, as compared to their non-fused counterparts.

To confirm this, cell fractionation experiments were performed, in which cell extracts were separated in soluble cytosolic, intermediate (containing the perinuclear spots) and nuclear fractions, as previously described [32] (Figure 8B, upper panel). Quantification of the amounts of Tax in all three fractions (total, lower panel) revealed that the total amounts of Tax-SUMO-1 or Tax-P79AQ81A-SUMO-1 were increased compared to their respective non-fused counterpart. This increase was due to higher amounts of either Tax-SUMO-1 or Tax-P79AQ81A-SUMO-1 in the cytosolic fraction (lower panel) with few changes in the two other fractions (quantification not shown). This confirms the confocal microscopy observations (Figure 8A) and suggests that fusion of SUMO-1 stabilizes Tax in the cytosol.

Since Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains was correlated to the cytoplasmic localization of Tax [32], we compared the levels of ubiquitination of fused and non-fused proteins (Figure 8C). Strikingly, we found that fusion of SUMO-1 increased the conjugation to K63-linked ubiquitin chains of Tax-P79AQ81A but not of wt Tax.

Altogether these results indicate that fusion of SUMO-1 only partially rescues the formation of nuclear bodies by Tax-P79AQ81A. Moreover, they reveal an unexpected effect of the SUMO-1 fusion that stabilizes wt Tax and Tax-P79AQ81A in the cytosol and increases the ubiquitination of the mutant.

Discussion

In this study, we directly analyzed the role of Tax nuclear bodies and Tax SUMOylation on NF- κ B activation.

Previous studies have described that Tax forms nuclear spots called Tax nuclear bodies or Tax speckled structures [16,17]. A Tax speckled structure localization signal (TSLS) positioned between residues 50 and 75 was subsequently mapped in the Tax sequence [18]. In order to identify new functional motifs of Tax, we selected the PxQxT motif at position 79–83 because it fits with a TRAF-binding motif and is adjacent to the TSLS. We found that this motif does not control Tax interaction with the TRAF since its mutation alters neither Tax ubiquitination (this study) nor the co-precipitation of Tax with either TRAF2 or TRAF5 (data not shown). In contrast, mutations of the P79 and Q81 residues dramatically reduce the formation of Tax nuclear bodies, confirming the role of the TSLS and showing that this sequence includes the PxQ motif.

We and others have demonstrated that Tax ubiquitination, especially conjugation to K63-linked ubiquitin chains, permits Tax binding to NEMO [24,30,32]. Here we report that Tax-P79AQ81A, which is conjugated to either total ubiquitin or K63-linked ubiquitin chains at the same level than wt Tax, binds to NEMO and activates IKK like wt Tax. Moreover, analysis of a series of Tax mutants allowed us to show that the amount of endogenous phospho-IKK α / β coprecipitated with Tax correlates with the level of Tax ubiquitination but not SUMOylation. These findings confirm the critical role of Tax ubiquitination in NEMO binding and IKK activation and also demonstrate that Tax SUMOylation is dispensable for these processes. Tax conjugation to K63-linked ubiquitin chains was also shown to relocalize Tax and NEMO to perinuclear spots [32,33]. However, recent findings showed that NEMO targeting to perinuclear spots is also impaired upon siRNA-mediated SUMO silencing [19]. Using both microscopy analysis and cell fractionation, we found that endogenous NEMO is recruited in perinuclear spots at the same level in cells producing either wt Tax or Tax-P79AQ81A. Hence, lowering Tax SUMOylation has no effect on NEMO targeting to cytoplasmic spots. The effect of SUMO silencing could be explained by the role of a minor fraction of

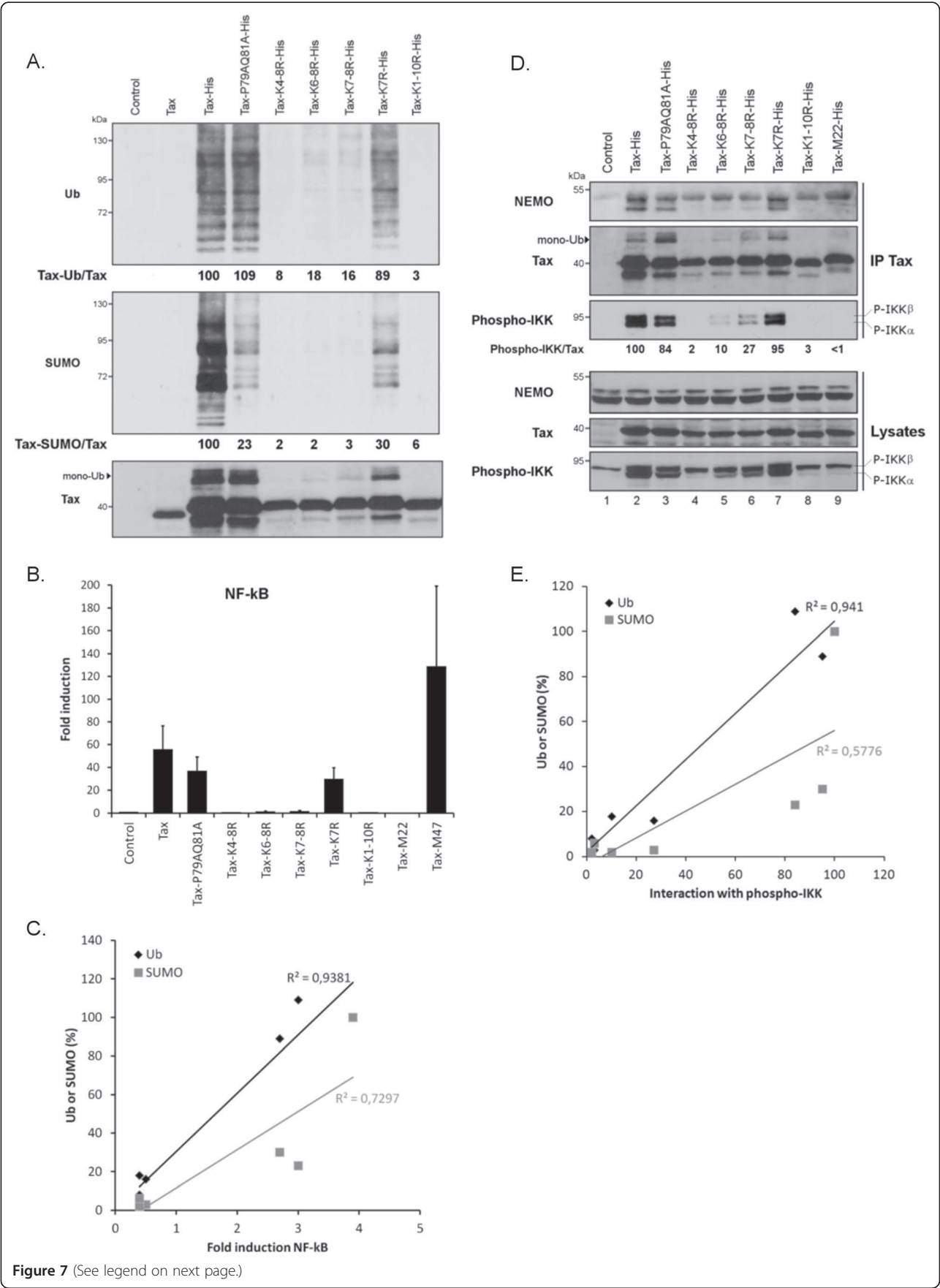


Figure 7 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 7 The degree of Tax NF- κ B activity correlates with the levels of Tax ubiquitination but not SUMOylation. (A) NiNTA experiments performed in 293 T cells showing the levels of Tax conjugation to endogenous ubiquitin or SUMO. 293 T cells were transfected as indicated and proteins purified on Nickel columns were revealed using anti-Ubiquitin, anti-SUMO-2/3 or the anti-Tax sera. The percentages of ubiquitinated or SUMOylated Tax were normalized on the amount of unconjugated Tax and expressed in comparison to wt Tax (100%). (B) NF- κ B reporter assay in 293 T cells. Cells were transfected with control or Tax-His constructs along with the NF- κ B or the Renilla luciferase plasmid for normalization. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the ratio of the control plasmid. Results represent the means and standard error of the means (SEM) from three independent experiments performed in duplicates. (C) The level of either ubiquitination or SUMOylation of the Tax mutants was plotted against their NF- κ B activities. The regression line shows a correlation between Tax NF- κ B activity and ubiquitination (determination coefficient = 0.94) but not SUMOylation (determination coefficient = 0.73). (D) Association of the Tax proteins to the IKK complex in 293 T cells. Total proteins (Lysates) or proteins precipitated using the anti-Tax mab (IP Tax) were blotted with anti-NEMO, anti-phospho-IKK or the anti-Tax sera, as indicated. (E) The regression line shows a correlation between Tax binding to phospho-IKK α / β and ubiquitination (determination coefficient = 0.94) but not SUMOylation (determination coefficient = 0.58).

SUMOylated Tax or of a SUMOylated unknown substrate in the cytoplasmic targeting of NEMO.

Tax nuclear bodies were previously reported to contain RelA and NEMO and therefore identified as transcriptionally active structures [16,19,20]. Surprisingly, we found that lack of nuclear body formation by Tax-P79AQ81A does not prevent this mutant from activating both the cytoplasmic and nuclear steps of the NF- κ B pathway. Importantly, such proper NF- κ B promoter activation was observed not only in adherent cells but also in T cells, notably CD4⁺ primary T cells. The composition of Tax nuclear bodies has essentially been studied in transfected adherent cells [15-17], and we were indeed able to detect these structures in all transfected cells, including T cells. However, using the same staining procedure, we observed that Tax nuclear bodies are nearly absent in HTLV-1-infected T cells. Hence, Tax nuclear bodies appear to be visible when Tax is transiently produced but not in an endogenous situation. This may suggest that nuclear bodies represent a storage compartment rather than transcriptionally active structures. However, it cannot be excluded that small clusters of Tax, undetectable by confocal microscopy, are indeed formed in HTLV-1-infected T cells. Further investigations are therefore needed to clarify the pattern and role of nuclear Tax, in particular in HTLV-1-infected CD4⁺ T cells.

Our work also allowed us to further explore the relationship between Tax ubiquitination and Tax SUMOylation. Indeed, as mentioned above, Tax-P79AQ81A mutant whose endogenous SUMOylation is reduced by around 80% is ubiquitinated at the same level as wt Tax, both in terms of total ubiquitination and specific conjugation to K63-linked ubiquitin chains. This strongly suggests that Tax SUMOylation is dispensable for Tax ubiquitination. That Tax SUMOylation may represent a signal for Tax ubiquitination was indeed recently proposed based on findings showing that RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin ligase (STUbL), was able to modulate Tax ubiquitination [27]. It was shown that RNF4 induced the ubiquitination of a SUMO-1 fused recombinant Tax

protein *in vitro* and that siRNA-mediated depletion of RNF4 abolished Tax ubiquitination. However, we found here that the SUMO-1 fused form of Tax was ubiquitinated at comparable level as non-fused Tax in HeLa cells. Moreover, we show that in contrast to RNF4 depletion, low Tax SUMOylation does not prevent Tax ubiquitination in cells. Of note, a GFP-tagged Tax was used in the RNF4 study [27] while our experiments were performed using a Tax-6his construct, which could lead to difference in Tax modifications and/or localization. In addition, it cannot be excluded that the low residual level of SUMOylation of Tax-P79AQ81A could be still sufficient to promote Tax ubiquitination. However, this would likely have been associated to a certain degree of reduction of Tax ubiquitination, as observed in RNF4-depleted cells [40]. Along with these findings, our data suggest therefore that RNF4 may not directly modulate wild-type Tax ubiquitination, but acts in an indirect manner by interfering with ubiquitination machineries or with direct regulators of Tax ubiquitination.

We previously concluded that ubiquitination and SUMOylation were both required for optimal NF- κ B activation by Tax through analysis of lysine mutants and SUMO-1-fused proteins. In this study, we revisited the role of Tax SUMOylation through a direct approach based on an ubiquitinated but intrinsically weakly SUMOylated Tax mutant. We found that Tax-P79AQ81A retains most of the NF- κ B activity of wt Tax, while in the same conditions, very little NF- κ B activity was measured for a mutant defective for both ubiquitination and SUMOylation (Tax-K4-8R). Potent NF- κ B activation by Tax-P79AQ81A was not only observed in 293 T cells and HeLa cells but also in T cells. Indeed, Tax-P79AQ81A is as active as wt Tax in CEM T cells and more importantly, in primary CD4⁺ T lymphocytes. Of note, study of another mutant, K7R, confirms that weak SUMOylation does not preclude NF- κ B activation. Finally, we were able to document that the abilities to activate a NF- κ B promoter of a series of Tax mutants correlate with their levels of ubiquitination but not of SUMOylation. It could be argue that low level of SUMOylation would be

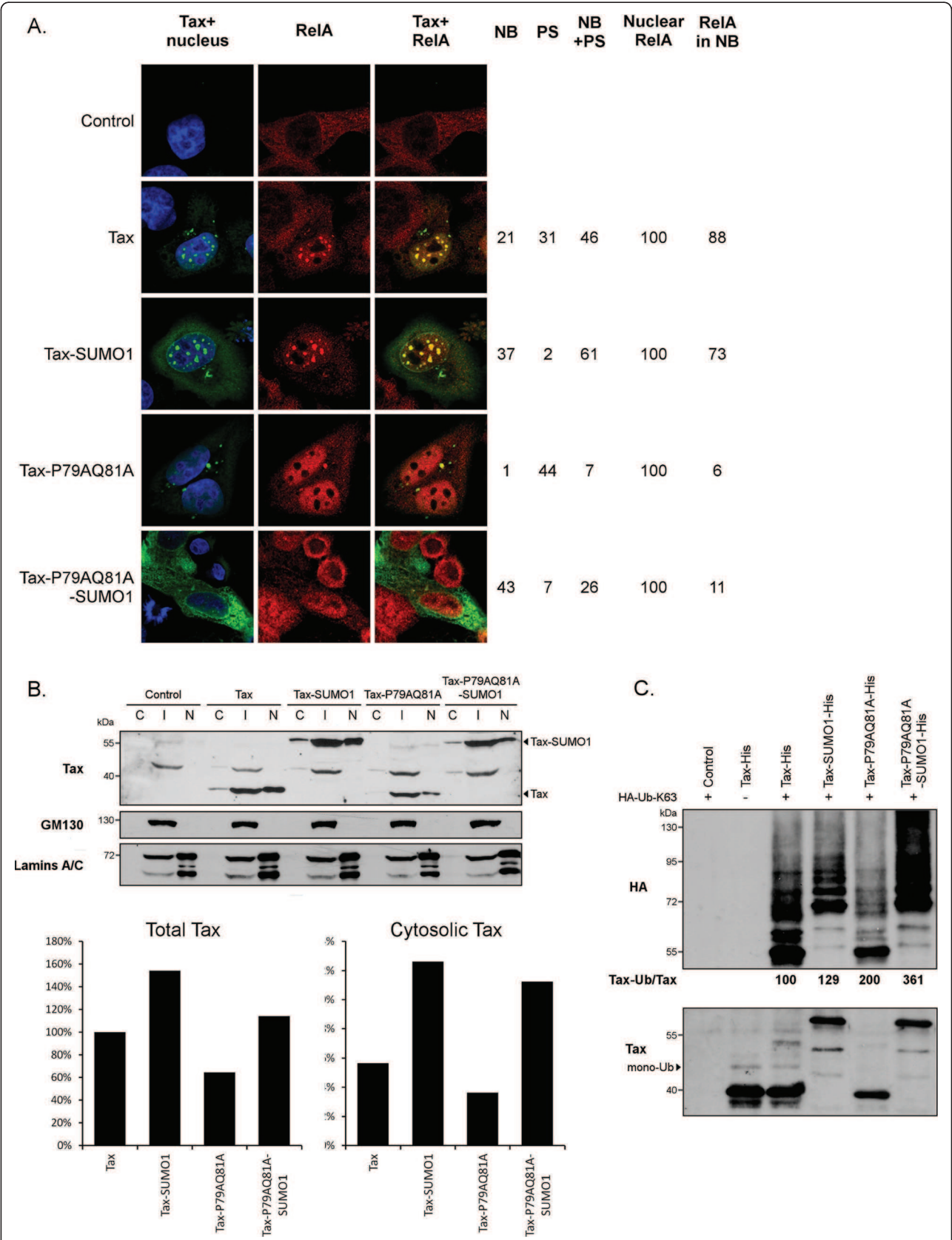


Figure 8 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 8 SUMO-1 fusion increases the cytosolic level and ubiquitination of Tax-P79AQ81A. (A) Confocal microscopy analysis showing the distribution of Tax or Tax-P79AQ81A fused or not to SUMO-1 (green) and of endogenous RelA (red) as well as nucleus staining (blue). The percentages of cells containing Tax in only nuclear bodies (NB), perinuclear spots (PS) or in both locations (NB + PS) are indicated. The percentages of cells containing RelA in the nucleus and the percentages of nuclear bodies-positive cells containing RelA in nuclear bodies are also indicated. At least 100 cells were analyzed in each condition. (B) Cell fractionation analysis. Cell extracts were separated in a cytosolic (C), intermediate (I) and nuclear (N) fraction as described [32]. Upper panel: Proteins were blotted with either an anti-Tax sera; anti-GM130, a marker of the intermediate fraction (Golgi apparatus), or anti-Lamins A/C, a marker of the nuclear fraction. Lower panel: the intensity of the Tax bands in all three fractions was quantified (Total Tax) and normalized to 100% for wt Tax. The proportion of Tax in the cytosolic fraction was calculated by dividing the intensity of each cytosolic Tax band by the value of Total Tax. (C) Ubiquitination of non-fused or fused wt Tax and Tax-P79AQ81A proteins. Ni-NTA experiments were performed in HeLa cells transfected with a control plasmid or the Tax-His constructs together with a HA-Ub-K63 plasmid. The percentages of HA-Ub-K63 conjugated products were normalized on the amount of unconjugated Tax and expressed in comparison to wt Tax (100%).

sufficient to regulate some Tax activities, even in absence of Tax nuclear bodies. However, our findings provide strong evidence that Tax SUMOylation is not a key determinant for Tax-induced NF- κ B activation.

That low SUMOylation does not alter Tax-induced NF- κ B activation appears to contradict our previous findings showing that fusion of SUMO-1 to lysine mutants restored their NF- κ B activities. However, we believe that our current and earlier data can be reconciled in light of recent findings from other groups. Indeed, we and others previously noticed that the SUMO-1 fusion restores the NF- κ B activity of some but not all lysine Tax mutants: i.e., it restores the NF- κ B activities of Tax-K6-8R or Tax-K7-8R (also referred to as Tax-R4-6 K), which retains partial ubiquitination, but not that of Tax-K4-8R, which is no longer ubiquitinated [20,24]. Moreover, we documented that fusion of SUMO-1 does not increase the NF- κ B activity of either wt Tax [24] or Tax-P79AQ81A (data not shown), which are both fully ubiquitinated. Fusion of SUMO-1 appears, therefore, to only enhance the NF- κ B activity of partially but not fully ubiquitinated Tax proteins. As mentioned above, RNF4 was recently shown to induce the ubiquitination of a recombinant GFP-Tax protein fused to SUMO-1 *in vitro* [27]. Hence, artificial fusion of SUMO-1 to the Tax mutants may similarly enhance their ubiquitination by facilitating the interaction with RNF4. Strikingly, it was previously reported that fusion of SUMO-1 increases the endogenous ubiquitination of Tax-K7-8R/Tax-R4-6 K but not Tax-K4-8R [20]. Furthermore, we show here that fusion of SUMO-1 stabilizes both Tax and Tax-P79AQ81A in the cytosol but only significantly increases ubiquitination of Tax-P79AQ81A. This latter effect is reminiscent of the cytoplasmic relocalization and enhanced ubiquitination of the GFP-tagged Tax construct upon RNF4 overexpression [27]. Why RNF4 would only increase the ubiquitination of Tax mutants but not wt Tax remains to be elucidated. Because these proteins differ by the presence or absence of SUMOylation, it could be speculated that the natural SUMO chains of Tax may somehow prevent the interaction of wt Tax or Tax-

SUMO-1 with RNF4. Whatever the exact mechanism involved, these findings support the view that the effect previously attributed to the fusion of SUMO-1 to lysine Tax mutants was actually linked to Tax stabilization and/or facilitation of Tax ubiquitination.

Conclusions

Our findings provide strong evidence that Tax SUMOylation and formation of Tax nuclear bodies are dispensable for proper NF- κ B pathway activation by Tax, especially in natural target cells of HTLV-1 infection. In contrast, preventing both ubiquitination and SUMOylation of Tax is detrimental for NF- κ B activation, highlighting the critical importance of the ubiquitin-dependent cytoplasmic events that involve the Tax/IKK interaction. Targeting ubiquitination pathways has emerged as a new promising therapeutic approach of malignancies [41]. Given the critical role that Tax-induced NF- κ B activation plays in HTLV-1-induced T cell transformation [5], such approach would be especially relevant in the treatment of HTLV-1-induced T-cell malignancies.

Methods

Cell culture and transfection

HeLa and 293 T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and antibiotics (Invitrogen) and were transfected using the lipofectamine reagent (Invitrogen). HTLV-1-infected T cells C8166 and HUT-102 as well as HTLV-1-negative CEM T cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented as above along with 0.5% glucose and were transfected using the DMRIE-C reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

Primary human CD4⁺ T cells were purified from peripheral blood samples of healthy donors from EFS (Etablissement Français du Sang, Paris). After separation of mononuclear cells by density gradient, CD4⁺ T cells were isolated by positive selection using CD4⁺ T lymphocyte enrichment immunomagnetic beads (Beckton Dickinson, France). Purified CD4⁺ T cells were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented as above and

containing 10% inactivated human serum (Sigma Aldrich) along with 50 IU/mL interleukin-2 (IL-2, PeproTech, France) and 3 mg of phytohemagglutinin-M (PHA-M, Sigma). CD4⁺ T cells were transfected using the Amaxa nucleofector (VPA-1002, Lonza) with the T23 program following the manufacturer's instructions.

Plasmids

All the Tax constructs used in this study encode proteins fused to a C-terminal 6His tag (His). Tax-His, lysine Tax mutants, Tax-M22-His and Tax-M47-His cloned in the pSG5M vector, HTLV-1-LTR-Luc, NF- κ B-Luc and pRL-TK plasmids were described elsewhere [24,32]. To generate the Tax-P79AQ81A mutant, a fragment comprised between the EcoRI and PmlI restriction sites of the Tax cDNA was mutated and amplified using the following primers: forward mutagenic Tax primer [5'CTCC-TTCGCGACCGCGAGAACCTCTAAG3'] and reverse mutagenic Tax primer [5'CTTAGAGGTTCTCGCGGT-CGCGAAGGAG3'] as well as the cloning primers TaxEcoF [5'GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTC3'] and TaxPmlIR [5'CACGTGGGGCAGGAGGGGC-CAGGTG3']. Two separated PCR reactions were first performed using either the forward mutagenic Tax primer and TaxPmlIR or the reverse mutagenic Tax primer and TaxEcoF, and the two amplified fragments were mixed and used to perform a global PCR reaction using the TaxEcoF and TaxPmlIR primers. The final PCR product was then cloned in the pTOPO vector (Invitrogen), and the EcoRI-PmlI fragment of pTOPO-Tax-P79AQ81A was finally introduced into the pSG5M vector. Correct introduction of the mutation was attested by the presence of a NruI site (introduced into the mutagenic primers). The Tax-P79AQ81A mutation was then introduced in the Tax-SUMO-1-6His plasmid by exchanging the EcoRI-PmlI fragments. The integrity of all constructs was verified by sequencing.

Antibodies

Tax was detected using a pool of sera from HTLV-1 infected individuals (anti-Tax sera) or the anti-Tax monoclonal antibody (mab) 168-A51 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA). The following primary antibodies were used: Ubiquitin (P4D1 from Tebu Bio or Fk2 from Millipore), Ub-K63 chains (D7A11; Cell Signaling Technology), SUMO 2/3 (ab3742; Abcam), HA-tag (12CA5; Roche), RelA/p65 (sc-372) and IKK γ (sc-8330) (Santa Cruz) phospho-IKK α/β (C84E11; Cell Signaling), GM-130 (610822, BD Biosciences) and Lamin A/C (2032, Cell signaling). HRP-conjugated anti-human, anti-mouse and anti-rabbit IgG (Promega) were used as secondary antibodies in western blot. The following secondary antibodies were used for immunostaining: goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 594 or Cyanine 5

(Invitrogen) and donkey anti-mouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Jackson ImmunoResearch).

Luciferase assays

Luciferase assays were performed in duplicates in 24-well plates for HeLa or 293 T cells (3×10^4 /well), CEM T cells (4×10^5 /well) or sorted CD4⁺ primary T cells (2.5×10^6 /well). CD4⁺ primary T cells were starved by removing PHA and IL-2 from the culture medium 24 h before transfection. HeLa, 293 T and CEM cells were cotransfected with 500 ng of either the NF- κ B-Luc or HTLV-1-LTR-Luc (CREB) reporter plasmid, 50 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK and 1 μ g of the control or the Tax plasmids. CD4⁺ primary T cells were cotransfected with 2 μ g of either the NF- κ B-Luc or HTLV-1-LTR-Luc reporter plasmid, 500 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK and 3 μ g of the control or the Tax plasmids. Luciferase activity was quantified 24 h post-transfection for 293 T cells or 48 h post-transfection for HeLa cells or T cells using the Dual Luciferase Assay System (Promega) and values were normalized with Renilla activity. Statistical analyses were performed using the student test.

Cell lysis, cell fractionation, immunoprecipitation and immunoblot

Preparations of cellular aggregates were performed as described in [37]. Cell fractionation in cytosolic, intermediate and nuclear fractions was performed as described in [32].

Immunoprecipitations were carried out as follows: at 24 h post-transfection, HeLa cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 150 mM NaCl) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Cell lysates were incubated overnight with the anti-Tax mab at 4°C, and antibody complexes were captured on protein G-sepharose beads (GE Healthcare) 1 h at 4°C. Sepharose beads were then washed 5 times in wash buffer (120 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH8, 0.2 mM NaF, 0.2 mM EGTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% NP40) before elution in Laemmli buffer.

Proteins in cell fractions, immunoprecipitated proteins and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with specific antibodies. For quantification, shortly exposed films were scanned with an AGFA scanner, and signal densities of proteins were measured with ImageJ software (Wayne Rasband; NIH). Signal density in an empty lane was also measured and subtracted from the signal of each band.

Ni-NTA pull-down

At 24 h post-transfection, HeLa cells were lysed in reducing and highly denaturing conditions in buffer A (6M

Guanidium-HCl, 0.1M NaH₂PO₄, 10 mM imidazole, pH 8) and incubated with Ni²⁺-NTA (nitrilotriacetic acid) beads (Sigma) for 3 h at room temperature. The beads were washed three times in buffer A, twice in buffer B (buffer A diluted 1:4 in buffer C) and twice in buffer C (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM imidazole). The proteins bound were eluted in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and blotted with specific antibodies. Film quantification was performed as described above.

Confocal analysis

HeLa or 293 T cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates the day before transfection and staining was performed 24 h post-transfection. At 24 h post-transfection, transfected CEM T cells were washed once with PBS and deposited onto poly-L-lysine coated coverslips in RPMI 1640 medium for 1 h at 37°C. Both cell types were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed twice with PBS, permeabilized with cold methanol for 5 min, and washed twice with PBS. The cells were incubated in PBS containing 2% BSA and 0.1% Tween for 30 min and then with primary antibodies diluted in PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween for 1 h. After 3 washes with PBS containing 0.1% Tween, the cells were incubated with secondary antibodies diluted in PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween for 45 min. The cells were washed with PBS-Tween buffer, and incubated with DAPI (Sigma) diluted in PBS for 10 min for nucleus staining. After two washes with PBS, the coverslips were mounted in FluorSave Reagent (Calbiochem). Laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS resonant scanner multi-photon (spinning disc) with a 63X objective, and images were analyzed using ImageJ software.

Additional files

Additional file 1: Figure S1: Subcellular localization of wt Tax and Tax-P79AQ81A in the cells. Description of data. Confocal microscopy analysis performed in HeLa cells showing Tax localization (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). The percentages of cells containing Tax in only nuclear bodies (NB), in only perinuclear spots (PS) or in nuclear bodies + perinuclear spots (NB + PS) are indicated for both wt Tax and Tax-P79AQ81A. At least 200 cells were analyzed. NB and PS are indicated by arrows and arrow heads, respectively.

Additional file 2: Figure S2. CREB promoter activities of the Tax proteins used in the study. Description of data. (A-D) Comparison of the CREB promoter activities of wt Tax and Tax-P79AQ81A in Tax-transfected HeLa cells (A), 293 T cells (B), CEM T cells (C) and primary CD4⁺ T cells (D). Cells were transfected with a control plasmid or with the Tax-His constructs along with the CREB reporter plasmid and the Renilla luciferase expression plasmid for normalization. (E) CREB promoter activities of the lysine Tax mutants in 293T cells. In all experiments, the M22 (defective for the NF-κB pathway) and M47 (defective for the CREB pathway) mutants were included as controls. Fold induction was calculated by dividing the firefly/renilla ratio of each Tax protein with the firefly/renilla ratio obtained with the control plasmid. The results

represent the means and standard error of the means (SEM) from at least four independent experiments performed in duplicates.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ABo. designed and performed the work, analyzed the data and wrote the paper. V.R. performed experiments with primary cells, analyzed the data and edited the paper. P.N and M.N contributed to biochemical experiments and analyzed data. M.C., L.W. and S.P. contributed to molecular biology experiments. A.Ba. and R.M contributed reagents and ideas for the work and edited the paper. L.B. designed experiments and edited the paper. C.P. designed and supervised the study and wrote the paper. All authors approved the submitted manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Anne-Lise Haenni, Florence Margottin-Goguet and Cecilia Ramirez for critical reading of the manuscript and members of the Cellular Imaging platform of the Cochin Institute for their help. We thank the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for the anti-Tax mab. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité de Paris), Institut National du cancer (InCA), Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA) and Fondation de France.

Author details

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France. ²CNRS, UMR8104, Paris, France. ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁴Department of Internal Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon. ⁵INSERM, U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

Received: 3 March 2012 Accepted: 1 September 2012

Published: 25 September 2012

References

- Journo C, Douceron E, Mahieux R: HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* 2009, **4**:425-440.
- Taylor JM, Nicot C: HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis* 2008, **13**:733-747.
- Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L: The HTLV-1 tax interactome. *Retrovirology* 2008, **5**:76.
- Peloponese JM Jr, Kinjo T, Jeang KT: Human T-cell leukemia virus type 1 tax and cellular transformation. *Int J Hematol* 2007, **86**:101-106.
- Robek MD, Ratner L: Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol* 1999, **73**:4856-4865.
- Vallabhapurapu S, Karin M: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:693-733.
- Harhaj EW, Sun SC: IKKgamma serves as a docking subunit of the IkkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus tax protein. *J Biol Chem* 1999, **274**:22911-22914.
- Shembade N, Ma A, Harhaj EW: Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 2010, **327**:1135-1139.
- Journo C, Filipe J, About F, Chevalier SA, Afonso PV, Brady JN, Flynn D, Tangy F, Israel A, Vidalain PO, et al: NRP/Opineurin cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000521.
- Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA, Matesic LE, Harhaj EW: The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol* 2008, **9**:254-262.
- Yu Q, Minoda Y, Yoshida R, Yoshida H, Iha H, Kobayashi T, Yoshimura A, Takaesu G: HTLV-1 tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **365**:189-194.
- Sun SC, Yamaoka S: Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* 2005, **24**:5952-5964.

13. Petropoulos L, Lin R, Hiscott J: Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology* 1996, **225**:52–64.
14. Suzuki T, Hirai H, Yoshida M: Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* 1994, **9**:3099–3105.
15. Baydoun H, Duc-Dodon M, Lebrun S, Gazzolo L, Bex F: Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* 2007, **386**:191–201.
16. Bex F, McDowall A, Burny A, Gaynor R: The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol* 1997, **71**:3484–3497.
17. Semmes OJ, Jeang KT: Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol* 1996, **70**:6347–6357.
18. Fryrear KA, Durkin SS, Gupta SK, Tiedebohl JB, Semmes OJ: Dimerization and a novel Tax speckled structure localization signal are required for tax nuclear localization. *J Virol* 2009, **83**:5339–5352.
19. Kfoury Y, Setterblad N, El-Sabban M, Zamborlini A, Dassouki Z, El Hajj H, Hermine O, Pique C, de The H, Saib A, Bazarbachi A: Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 2011, **117**:190–199.
20. Lamsoul I, Lodewick J, Lebrun S, Brasseur R, Burny A, Gaynor RB, Bex F: Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 2005, **25**:10391–10406.
21. Chin KT, Chun AC, Ching YP, Jeang KT, Jin DY: Human T-cell leukemia virus oncoprotein tax represses nuclear receptor-dependent transcription by targeting coactivator TAX1BP1. *Cancer Res* 2007, **67**:1072–1081.
22. Durkin SS, Guo X, Fryrear KA, Mihaylova VT, Gupta SK, Belgnaoui SM, Haoudi A, Kupfer GM, Semmes OJ: HTLV-1 tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2008, **283**:36311–36320.
23. Lodewick J, Lamsoul I, Bex F: Move or die: the fate of the tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* 2011, **3**:829–857.
24. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de The H, Pique C, Bazarbachi A: Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* 2006, **107**:4021–4029.
25. Peloponese JM Jr, Iha H, Yedavalli VR, Miyazato A, Li Y, Haller K, Benkirane M, Jeang KT: Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* 2004, **78**:11686–11695.
26. Chiari E, Lamsoul I, Lodewick J, Chopin C, Bex F, Pique C: Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J Virol* 2004, **78**:11823–11832.
27. Fryrear KA, Guo X, Kerscher O, Semmes OJ: The SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein tax. *Blood* 2012, **119**:1173–1178.
28. Lavorgna A, Harhaj EW: An RNA interference screen identifies the deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF-kappaB activation. *J Virol* 2012, **86**:3357–3369.
29. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT: Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF-kappaB signaling. *J Virol* 2011, **85**:6212–6219.
30. Shembade N, Harhaj NS, Yamamoto M, Akira S, Harhaj EW: The human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol* 2007, **81**:13735–13742.
31. Shibata Y, Tanaka Y, Gohda J, Inoue J: Activation of the I kappa B kinase complex by HTLV-1 tax requires cytosolic factors involved in tax-induced polyubiquitination. *J Biochem* 2011, **150**:679–686.
32. Kfoury Y, Nasr R, Favre-Bonvin A, El-Sabban M, Renault N, Giron ML, Setterblad N, Hajj HE, Chiari E, Mikati AG, et al: Ubiquitylated tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 2008, **27**:1665–1676.
33. Harhaj NS, Sun SC, Harhaj EW: Activation of NF-kappa B by the human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein is associated with ubiquitin-dependent relocalization of I kappa B kinase. *J Biol Chem* 2007, **282**:4185–4192.
34. Gatz ML, Dayaram T, Marriott SJ: Ubiquitination of HTLV-I tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* 2007, **4**:95.
35. Au PY, Yeh WC: Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv Exp Med Biol* 2007, **597**:32–47.
36. Ye H, Park YC, Kreishman M, Kieff E, Wu H: The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* 1999, **4**:321–330.
37. Garcia-Mata R, Bebek Z, Sorscher EJ, Sztul ES: Characterization and dynamics of aggregates formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 1999, **146**:1239–1254.
38. Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D: HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. *Virology* 1993, **196**:15–24.
39. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, **77**:7415–7419.
40. Wang YT, Yang WB, Chang WC, Hung JJ: Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol* 2011, **414**:1–14.
41. Sun Y: Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003, **2**:623–629.

doi:10.1186/1742-4690-9-77

Cite this article as: Bonnet *et al.*: Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* 2012 **9**:77.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



**HTLV-2 Tax-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of
Tax conjugation to ubiquitin and SUMO**

Running title: HTLV Tax1 vs Tax2 requirements for NF- κ B activation

**Chloé Journo^{1,2}, Amandine Bonnet^{3,4,5}, Arnaud Favre-Bonvin^{3,4,5}, Jocelyn
Turpin^{1,2}, Jennifer Vinera^{1,2}, Emilie Côté^{1,2}, Sébastien Alain Chevalier^{1,2},
Younna Kfoury⁶, Ali Bazarbachi⁶, Claudine Pique^{3,4,5,#}, Renaud Mahieux^{1,2,#}**

1: Oncogenèse Rétrovirale, INSERM U758, Lyon, France

2: Ecole Normale Supérieure, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

3: INSERM U1016, Institut Cochin, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France

4: CNRS UMR8104, Paris, France

5: Université Paris Descartes, Paris, France

6: Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, American University of
Beirut, Beirut 1107 2020, Lebanon

Equal contribution. Correspondence to:

Renaud Mahieux

INSERM U758 Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon
Cedex 07, France

Tel: (33)-4-72-72-87-93

Fax: (33)-4-72-72-81-37

Email: renaud.mahieux@ens-lyon.fr

or

26 Claudine Pique
27 Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France.
28 Tel:(33)-40-51-64-86
29 Fax: (33)-1-40-51-64-54
30 Email: Claudine.pique@inserm.fr
31
32 Abstract word count: 218 (max 250)
33 Text word count: 5234

ABSTRACT

Permanent activation of the NF- κ B pathway by the HTLV-1 Tax (Tax1) viral transactivator is a key event in the process of HTLV-1-induced T lymphocyte immortalization and leukemogenesis. Although encoding a Tax transactivator (Tax2) that activates the canonical NF- κ B pathway, HTLV-2 does not cause leukemia. These distinct pathological outcomes might be related, at least in part, to distinct NF- κ B activation mechanisms. Tax1-mediated NF- κ B activation requires ubiquitination and SUMOylation of the viral protein: Tax1 ubiquitination allows recruitment of the IKK- γ /NEMO regulatory subunit of the IKK complex together with Tax1 into centrosome/Golgi-associated cytoplasmic structures followed by activation of the IKK complex and RelA/p65 nuclear translocation. SUMOylation was proposed to allow the formation of transcriptionally active Tax1 nuclear speckles. Herein, we compared the ubiquitination and SUMOylation patterns of Tax2 and Tax1. We show that in contrast to Tax1, Tax2 conjugation to endogenous ubiquitin and SUMO is barely detectable. Consistent with these observations, Tax2 conjugation to ubiquitin as well as Tax2-mediated NF- κ B activation are not affected by overexpression of the E2 conjugating enzyme Ubc13. We further demonstrate that a non-ubiquitinable and non-SUMOylable lysineless Tax2 mutant retains a significant ability to activate transcription from a NF- κ B-dependent promoter after partial activation of the IKK complex and induction of RelA/p65 nuclear translocation. These results indicate that Tax2-mediated NF- κ B activation does not require Tax2 ubiquitination and SUMOylation.

INTRODUCTION

Human T-cell Leukemia Viruses type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) share a similar genomic organization with the presence, in the 3' region of the genome, of a pX region encoding the viral Tax transactivator (Tax1 and Tax2, respectively) (reviewed in (14)). However, while HTLV-1 is the agent of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATLL), a fatal disorder that affects 1-5% of infected individuals (2, 54), and of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy (TSP/HAM), a chronic neurological inflammatory disease (19, 40), HTLV-2 infection has only been associated with cases of TSP/HAM-like diseases (25, 28), and never with a malignant hematological disease. Identification of distinctive features of Tax1 and Tax2 functions that would contribute to differences in pathogenesis has therefore been an active area of research.

Key distinctions have been identified between Tax1 and Tax2 in connection with the transformation abilities of HTLV-1 vs HTLV-2 (for a review, see (22)). Critical functions were assigned to a PDZ-binding motif (PBM) located in the carboxy-terminal part of Tax1 that is absent in Tax2. Tax1 PBM was first involved in induction of DNA damage-indicative micronuclei, a feature that is not shared by Tax2 (45). This motif was also shown to be responsible for Tax1-induced perturbation of hematopoietic CD34⁺ precursors maturation *in vitro*, a property that is not shared by Tax2 and that could be linked to viral persistence in hematopoietic precursors reservoirs *in vivo* (55, 56). Tax1 interaction with PDZ domain-containing cellular proteins such as Dlg was also suggested to be involved in Tax1 transforming activity (24).

In addition, Tax1 and Tax2 have been shown to bear distinct distributions in cells. Tax1 forms nuclear speckles (5, 6, 13, 44, 51) and is detected in

Golgi/centrosome-associated cytoplasmic domains (20, 30, 32, 37). Although it is also detectable in the nucleus, Tax2 is predominantly found in the cytoplasm of the cells (35, 46, 57, 58) (for a review, see (4)). Both proteins possess a nuclear export sequence located between amino acids 188-202 (1, 8). However, we previously showed that a 10-amino acid sequence located in the N-terminal part of the proteins (amino acids 90 to 100) dictates their divergent localization (35).

Interestingly, cytoplasmic localization of Tax1 was shown to be critical for the constitutive activation of NF- κ B observed in cells that express the viral protein (7, 38). Moreover, by analyzing Tax1/Tax2 chimeric proteins, we previously showed that their efficiency as NF- κ B activators is correlated with their cytoplasmic vs nuclear localization ratio (35). NF- κ B is a family of transcription factors involved in the control of cell growth and survival (34, 39). Depending on the nature of the inducing signal, NF- κ B may become activated either through the canonical or the non-canonical pathway. In contrast to Tax2, which activates only the canonical pathway, Tax1 constitutively activates both pathways (3, 12, 23, 35, 42, 43, 49, 57). The molecular determinant of the ability to activate the non-canonical pathway has been mapped to Tax1 amino acids 225-232 (49).

The I κ B kinase (IKK) complex is a central regulator of NF- κ B. It consists of two catalytic subunits, IKK- α and IKK- β , and of a regulatory subunit, IKK- γ /NEMO. In the canonical pathway, activation of the IKK complex leads to ubiquitination and degradation of I κ B α and to translocation of RelA/p65-p50 heterodimers into the nucleus (21). Although Tax1 directly interacts with IKK- γ /NEMO (62), the exact mechanism that leads to canonical NF- κ B activation is still a matter of investigation (3, 16, 29, 61, 64) (and for a review (53)). Tax1 undergoes post-translational modifications including phosphorylation, acetylation, ubiquitination and SUMOylation

that are important for its transcriptional activity. A critical role was assigned to Tax1 K63-linked polyubiquitination and SUMOylation in the activation of NF- κ B (9, 18, 20, 30-32, 36, 41) (for recent reviews, see (33, 47)). Tax1 sequence contains 10 lysine residues. Ubiquitination occurs on lysines K4 to K8, while SUMOylation is restricted to lysines K7 to K8 (9, 32, 36). Ubc13, an E2 conjugating enzyme, is required for Tax1 ubiquitination (48). RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin ligase, also allows the ubiquitination of a SUMO-1-Tax fusion protein *in vitro* and enhances Tax1 transcriptional activity on a NF- κ B-dependent promoter (15). On the other hand, the E3 ubiquitin ligase PDLIM2 mediates Tax1 K48-linked polyubiquitination, thereby targeting Tax1 to proteasomal degradation (63). Finally, another recent work demonstrated that USP20 deubiquitinates Tax1 and suppresses NF- κ B activation (64).

In contrast, very few data are available concerning the mechanism by which Tax2 activates the canonical NF- κ B pathway. We previously reported that Tax2 co-immunoprecipitates with IKK γ /NEMO in transfected cells (35), a result that was further confirmed by colocalization assays (3).

Tax1 K4 to K8 lysines, which are targeted by ubiquitination, are conserved in the Tax2 sequence. A recent report suggested that, as Tax1, Tax2 was both ubiquitinated and SUMOylated (57). However, analysis of Tax1 or Tax2 modifications were performed in cells over-expressing ubiquitin or SUMO proteins, which may lead to false-positive results (26). We therefore performed our experiments with endogenous ubiquitin, SUMO, and when possible Tax proteins. We first show that Tax2 colocalizes with IKK γ /NEMO in infected cells. We then demonstrate that Tax2, in contrast to Tax1, is barely conjugated to endogenous ubiquitin or SUMO, even when Ubc13 is over-expressed. We further show that a Tax2 mutant that can neither

131 be ubiquitinated nor SUMOylated still significantly activates the NF- κ B pathway.
132 These results provide the notion that Tax2 activates the NF- κ B pathway by a
133 mechanism independent of its ubiquitination and SUMOylation. We then demonstrate
134 that the carboxy-terminal region that surrounds Tax2 K4-8 is responsible for the lack
135 of ubiquitination and SUMOylation of the protein. Altogether, our results demonstrate
136 that Tax1 and Tax2 harbor distinctive patterns of conjugation to ubiquitin and SUMO
137 and that activation of the canonical NF- κ B pathway by Tax1 or Tax2 does not have
138 the same requirements towards Tax ubiquitination and SUMOylation.

139

140

141

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

Quickchange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene) (see supplemental Table 1 for primer sequences).

Nickel pulldown

Forty-eight hours post-transfection (Polyfect, Qiagen), HeLa cells were harvested in cold PBS, lysed in a highly denaturing lysis buffer and Ni-NTA pulldown was performed as described (9). Bound proteins were eluted in Laemmli buffer and processed for western immunoblot analyses. For whole cell lysates, cells were washed twice with PBS and lysed (Tris-HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 120 mM, EDTA 5 mM, NP40 0.5%, Na₃VO₄ 0.2 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM) in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics) and cell debris were pelleted by centrifugation.

Western immunoblot were performed as previously described (35). Analyses were performed with the following antibodies: anti-Histidine₆ (sc-804, Santa Cruz), anti-ubiquitin (sc-8017, Santa Cruz), anti-SUMO2/3 (ab3742, Abcam) or anti-HA (HA.11 clone 16B12, Eurogentec) antibodies. Total signal intensity of each lane was measured using ImageJ software (Wayne Rasband, NIH) and background signal intensities (empty vector lane) were subtracted. Values were then normalized to histidine signal intensities in the corresponding input. Signal intensity for Tax1-His modified forms (figure 1D) is expressed as a percentage of total Tax1-His signal intensity (unconjugated Tax + modified forms). Signal intensities for the modified forms of Tax1/2 chimeras (figure 6C) are expressed as a percentage of wild-type Tax1 modified forms.

Green Fluorescent Protein and indirect immunofluorescence analyses

Twenty-four hours post-transfection (Effectene, Qiagen), HeLa cells were processed for immunofluorescence analyses as previously described (35). Analyses were performed with the following antibodies: anti-Histidine₆ (sc-804, Santa Cruz or ab5000, Abcam), anti-GM130 (610823, BD Transduction Laboratories), anti- γ -tubulin (sc-7396, Santa Cruz), anti-calreticulin (PA3-900, Affinity BioReagents), anti-IKK- γ /NEMO (611306, BD Transduction Laboratories), anti-RelA (sc-372, Santa Cruz), fluorescein- or Texas-Red-conjugated goat anti-rabbit (Vector), horse anti-mouse (Vector) and donkey anti-goat (Jackson ImmunoResearch) antibodies. Coverglasses were washed, mounted in DAPI-containing Fluoromount G (Southern Biotech), and examined under a Leica SP5 spectral confocal microscope. A similar procedure was performed for C19 cells using the anti-Tax2 antibody (GP3738 (35)). For RelA/p65 nuclear translocation quantification, nuclei were delineated using ImageJ software and mean brightness of the nuclear RelA/p65 staining was calculated. Values obtained for non-transfected cells were then subtracted from those for Tax-expressing cells in the same field.

Co-immunoprecipitation assay

Twenty-four hours post-transfection (Lipofectamine, Invitrogen), HeLa cells were lysed (NaCl 120 mM, Tris-HCl pH 8 20 mM, NaF 0.2 mM, EGTA 0.2 mM, sodium deoxycholate 0.2%, NP-40 0.5%, protease and phosphatase inhibitors (Roche)). Cell lysates were incubated overnight with an anti-Histidine antibody (27-4710-01, GE Healthcare) at 4°C. Antibody complexes were captured on protein G-sepharose beads (GE Healthcare) for 1 h at 4°C. Sepharose beads were then washed 5 times in lysis buffer before elution in Laemmli buffer. Samples were loaded into 10% Bis-Tris gels, subjected to electrophoresis and transferred onto a

nitrocellulose membrane (Optitran BA-S83, Whatman). Membranes were analyzed using the following antibodies: anti-Histidine (27-4710-01, GE Healthcare), anti-IKK- γ /NEMO (sc-8330, Santa Cruz) and anti-phospho-IKK- α/β (C84E11, Cell Signaling Technology). Signal intensity for Tax1-K0- and Tax2-K0-co-immunoprecipitated partners are expressed as a percentage of the signal intensity obtained for wild-type Tax1 and Tax2, respectively, normalized to the input intensities.

Luciferase assays

HeLa cells were transfected (Effectene, Qiagen) with NF- κ B-luc or an HTLV-1-LTR-luc reporter plasmids (50 ng) together with either the pSG5M empty vector or the His-tagged Tax1/2 encoding plasmids (100 ng for wild-type and chimeric plasmids and 200 ng for K0 plasmids) and the indicated amount of Ubc13- or USP20-encoding plasmids. Amounts of transfected Tax plasmids were chosen as the lowest dose inducing significant NF- κ B activity. Transfections were carried out in the presence of a renilla luciferase vector (phRG-TK, 4 ng) in order to normalize for the transfection efficiency. Luciferase activity was assayed 18h post-transfection using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). When indicated, statistical unpaired t-tests were performed using Prism software and the value of the two-tailed P value was calculated.

RESULTS

Tax2 activates the NF- κ B pathway despite low levels of conjugation to endogenous ubiquitin and SUMO

Previous data previously obtained in transfected cells suggest that the mechanism of Tax2-induced NF- κ B activation involves Tax2 interaction with IKK γ /NEMO (3, 35). In order to better characterize this mechanism, we sought to confirm these results in HTLV-2 chronically infected T lymphocytes (C19 cell line). Immunofluorescence studies were performed in order to investigate the HTLV-2-dependent relocation of IKK γ /NEMO to Tax2-positive domains. As previously published (35), C19 cells were mixed with uninfected CEM T lymphocytes at a 1:10 ratio, allowing us to have an internal negative control, and the cover slip was stained for Tax2 and IKK- γ /NEMO. IKK- γ /NEMO spots were visible only in Tax2-positive cells where both proteins colocalized and formed cytoplasmic spots (figure 1A). These results demonstrate that Tax2 also recruits IKK- γ /NEMO in HTLV-2-infected T lymphocytes and further support the notion that the mechanism of Tax2-induced NF- κ B activation involves Tax2 interaction with IKK γ /NEMO.

Because Tax1 interaction with IKK γ /NEMO requires Tax1 ubiquitination, we set up an assay that allows comparison of Tax1 vs Tax2 ubiquitination patterns in transfected HeLa cells. A histidine tag was added to the carboxy-terminal end of Tax1 and Tax2 proteins, allowing Tax purification on Ni-NTA beads. We first performed a NF- κ B reporter gene assay to control that addition of the tag did not alter Tax function (figure 1B). Tax1 and Tax2 expression induced an approximately 10-fold induction of NF- κ B activity. As a control, an HTLV1-LTR-luciferase test was also performed and demonstrated similar activation of the reporter construct by the two

Tax proteins (see supplemental figure 1). These results demonstrate that histidine-tagged Tax1 and Tax2 are both potent NF- κ B activators in HeLa cells.

We then investigated the ubiquitination pattern of Tax1 vs Tax2. Tax1 K4 to K8 lysines, which are targeted by ubiquitination, are conserved in the Tax2 sequence (figure 1C). In order to avoid any false-positive results that could be due to ubiquitin over-expression, we compared the levels of Tax1 and Tax2 conjugation to endogenously expressed ubiquitin (figure 1D (a)). Tax pulldown was performed in a highly denaturant guanidine-containing buffer to prevent co-purification of any non-covalently bound partners, while allowing purification of post-translationally modified Tax proteins (9). Guanidine also inhibits all cellular deubiquitinase activities that would otherwise decrease the amount of modified Tax proteins that are retrieved. Surprisingly, no signal was observed for Tax2 when blotting the purified extracts with an anti-Ub antibody (figure 1D (a) lane 4). Consistent with previous reports (9, 20, 30, 32, 36), a ladder of Tax1 products was detected after blotting with the same anti-Ub antibody (figure 1D (a) lane 3), showing that Tax1 was properly conjugated to endogenous ubiquitin under the same experimental conditions.

We then investigated whether Tax2 was or not SUMOylated in cells expressing endogenous levels of SUMO proteins. Following pulldown, endogenously SUMOylated Tax proteins were revealed using a SUMO2/3 specific antibody (figure 1D (b)). No Tax2 signal was detected (figure 1D (b) lane 4) while, as expected from earlier studies (32, 36), SUMO-modified Tax1 forms were present (figure 1D (b) lane 3). Analysis of Tax modification under conditions where SUMO1 was over-expressed was also undertaken (see supplemental figure 2). SUMO1 is an isoform that is unable to form chains and can only monoSUMOylate proteins or terminate chains of poly-SUMO. SUMO1-modified Tax2 could barely be detected, while Tax1

SUMOylation was easily detected. Interestingly, both mono- and poly-SUMOylation of Tax1 by SUMO1 species were present, consistent with the presence of Tax1 products conjugated to a unique SUMO1 monomer on one or more lysines and/or to SUMO2/3 chains terminated by a SUMO1 monomer. Subsequent experiments were only performed with SUMO2/3.

Analysis of pulldown fractions indicated that Tax1-His and Tax2-His were bound equivalently to nickel beads (figure 1D (c)). Quantification of the ladder of Tax1 high molecular weight Tax1 products (figure 1D (c) lane 3) indicated that the level of modified Tax1 (ubiquitinated or SUMOylated) reached 25% of total Tax1. Such quantification could not be performed on Tax2 since no Tax2-modified forms were detected. Altogether, these results demonstrate that at the steady state and in contrast to Tax1, ubiquitinated and SUMOylated forms of Tax2 are barely detectable in HeLa cells expressing endogenous levels of ubiquitin and SUMO proteins. Similar results were obtained in 293T cells (data not shown).

Ubc13 is an E2 ubiquitin conjugating enzyme that has the unique feature to catalyze K63-linked polyubiquitination and is known to support Tax1 polyubiquitination (48). In order to confirm that Tax2 and Tax1 behave distinctly towards ubiquitination, we investigated the effect of over-expressing Ubc13 on Tax2 ubiquitination (see supplemental figure 3A). As expected, Ubc13 over-expression resulted in a 5-fold increase of Tax1 ubiquitination levels (supplemental figure 3A (a) lane 2 vs 1, note that a short exposure time is shown in order to limit saturation of the signal in lane 2 and to allow quantification). In contrast, even under those conditions Tax2 endogenous ubiquitination remained barely detectable (see supplemental figure 3A (a) lane 4 vs 3). We then performed NF- κ B reporter gene assays (see supplemental figure 3B). In accordance with results from the ubiquitination assay,

and contrary to Tax1 for which over-expression of Ubc13 induced a significant increase in NF- κ B promoter activation (unpaired t-test, $p=0.0063$), NF- κ B activation by Tax2 was not significantly changed upon over-expression of Ubc13 ($p=0.09$). Altogether, these results indicate that in contrast to Tax1, Tax2 is a potent NF- κ B activator despite very low levels of endogenous ubiquitination and SUMOylation.

Tax2 retains its ability to activate the canonical NF- κ B pathway in the strict absence of Tax2 ubiquitination and SUMOylation

Levels of Tax2 post-translational modifications that are undetectable under our experimental conditions might suffice to allow efficient activation of NF- κ B. Therefore, we studied the properties of a Tax2 mutant in which all 13 lysine codons were substituted by arginine codons and that can no longer be modified by either ubiquitin or SUMO (Tax2-K0, figure 2A). As expected, the lysineless Tax2-K0 mutant underwent neither ubiquitination nor SUMOylation (figure 2B (a) and (b) lane 5). As controls, strong signals were obtained in cells expressing Tax1 (lane 2), while a lysineless Tax1 construct (Tax1-K0-His) showed neither ubiquitination nor SUMOylation (lane 3). Wild-type and K0 Tax1 and Tax2 were equivalently bound to nickel beads (figure 2B (c)).

We then performed a NF- κ B reporter gene assay (figure 2C). Strikingly, expression of Tax2-K0 led to a significant NF- κ B activation (unpaired t-test, $p=0.0153$ compared to "Empty vector") that reached about 60% of that of wild-type Tax2 (non significant difference, $p=0.0790$). By contrast, and consistent with previously published results (30, 32, 36), Tax1-K0 was impaired in its ability to activate the NF- κ B signaling pathway (values equal to or smaller than the basal values). These results were reproduced in Jurkat T cells (data not shown), in which expression of

wild-type Tax2 led to an approximately 30-fold increase in NF- κ B activity compared to basal activity and in which Tax2-K0 also led to a significant, 18-fold induction of NF- κ B activity (unpaired t-test, $p=0.0217$ compared to “Empty vector”). The ability of the lysineless Tax1 and Tax2 mutants to activate transcription of an HTLV1-LTR-luc reporter gene was also assessed (see supplemental figure 4). While as previously reported the activity of Tax1-K0 was abolished (values equal to or smaller than the basal values) (30, 32, 36), Tax2-K0 retained significant activity ($p=0.0265$ compared to “Empty vector”). Taken together, these results demonstrate that in sharp contrast to Tax1, Tax2 is able to efficiently activate the NF- κ B pathway in the strict absence of modification by either ubiquitin or SUMO.

We then investigated the mechanism underlying the activation of NF- κ B by Tax2 and Tax2-K0. Tax1-induced NF- κ B activation is triggered by Tax1 binding to and clustering of IKK- γ /NEMO in perinuclear structures, followed by the phosphorylation of the IKK kinases IKK- α and IKK- β (20, 36). We therefore analyzed whether Tax2 and Tax2-K0 were able to induce perinuclear relocalization of IKK- γ /NEMO (figure 3A). Both Tax1 and Tax2 induced IKK- γ /NEMO relocalization in perinuclear spots where colocalization of both Tax protein with IKK γ /NEMO is found ((a) and (c) and quantification on the right). Although the absence of lysines drastically altered Tax2 localization (compare Tax2 signals in (c) and (d)), perinuclear spots containing IKK- γ /NEMO were still observed ((d) and quantification on the right). Consistent with previous data (30, 32), Tax1-K0 was diffuse and did not induce any IKK- γ /NEMO relocalization ((b)). Thus, Tax2-induced IKK- γ /NEMO perinuclear relocalization occurs despite the lack of Tax2 ubiquitination and SUMOylation. We next studied the ability of Tax2 and Tax2-K0 to bind to IKK- γ /NEMO (figure 3B). IKK- γ /NEMO co-precipitated with both Tax1 and Tax2 ((a) lanes 2 and 4), while it did not

with Tax1-K0 (lane 3). Importantly, IKK- γ /NEMO also co-precipitated with Tax2-K0 (lane 5), indicating that Tax2 interaction with IKK- γ /NEMO occurs in the absence of Tax2 ubiquitination and SUMOylation. Furthermore, contrasting with Tax1-K0, Tax2-K0 was still able to precipitate phospho-IKK- $\alpha\beta$ ((c) lane 5). Although the amount of precipitated phospho-IKK- $\alpha\beta$ found for Tax2-K0 reached only about 40% of that of wild-type Tax2, these results indicate that in contrast to Tax1, the strict absence of Tax2 ubiquitination and SUMOylation still allows significant activation of the IKK complex. Control western blots showed that equivalent amount of Tax-K0 proteins were expressed and/or immunoprecipitated compared to their wild-type counterparts ((b) and (e)). Control western blots were also performed for IKK- γ /NEMO and phospho-IKK α/β ((d) and (f)).

We next studied the nuclear translocation of the NF- κ B RelA/p65 subunit which is a well-established indicator of NF- κ B activation (figure 4). Both Tax1 and Tax2 proteins induced RelA/p65 nuclear translocation (figure 4A (a) and (c) RelA/p65 panel, compare Tax-expressing cells [arrows] to non-transfected cells [arrow heads]), while Tax1-K0 did not ((b)). Interestingly, Tax2-K0 also induced a significant nuclear translocation of RelA/p65 ((d) RelA/p65 panel, compare Tax-expressing cells [arrows] to non-transfected cells [arrow heads]). Quantification of nuclear RelA/p65 signal increase was performed (figure 4B). This allowed us to confirm that contrary to Tax1-K0 (lane 3 vs 2) Tax2-K0 induced an efficient RelA/p65 nuclear translocation (80% of wild-type Tax2-induced translocation, compare lane 5 vs 4). These results indicate that in contrast to Tax1, Tax2 is able to induce RelA/p65 nuclear translocation in the strict absence of Tax2 ubiquitination and SUMOylation.

Taken together, these results indicate that Tax2 is able to activate NF- κ B in the absence of prior conjugation to ubiquitin and SUMO, by a mechanism involving

binding to and activation of the IKK complex followed by RelA/p65 nuclear translocation.

In order to investigate whether this mechanism could require ubiquitination of cellular partners of Tax2 that would compensate for the low level (Tax2 WT) or absence (Tax2 K0) of Tax2 ubiquitination, we studied the impact of over-expression of USP20, a recently described deubiquitinase (64), on Tax mediated NF- κ B activation (figure 5). USP20 over-expression induced the shutdown of NF- κ B activation by wild-type Tax2 but also by Tax2-K0. Since the non-ubiquitinable Tax2-K0 protein cannot directly be targeted by the deubiquitinase activity of USP20, these results indicate that USP20 indirectly affects Tax2-K0 activity, probably by targeting ubiquitinated cellular proteins specifically necessary for Tax2-mediated NF- κ B activation. As a control, USP20 effects on Tax1-mediated NF- κ B activation were consistent with previous reports (64).

Ubiquitination and SUMOylation are determined by distinct domains of Tax

The clearly distinct Tax1 vs Tax2 post-translational modification pattern prompted us to investigate the determinants of such differences. Since K4 to K8 lysines are conserved in Tax2 (figure 1C), we reasoned that the differential ubiquitination and SUMOylation statuses of Tax1 and Tax2 are not linked to the presence or absence of the targeted lysines but rather to specific domains that surround these lysines. Alternatively, distinct Tax1 vs Tax2 post-translational modification pattern could be a consequence of distinct subcellular localizations that could be critical for interaction with the modification machineries. Indeed, as

mentioned above, Tax1 is both nuclear and cytoplasmic while Tax2 is predominantly cytoplasmic (35, 46, 58).

We therefore investigated the relationship between Tax1 and Tax2 sequence, localization and post-translational modification profiles using a series of Tax1/2 chimeric proteins and Tax1 or Tax2 as controls (figure 6A). As previously described (5, 6, 13, 20, 30, 32, 37, 44, 51), Tax1 displayed a mixed nuclear and cytoplasmic localization (figure 6B, see frequencies on the right of the panel). In the nucleus, Tax1 formed nuclear speckles whereas Tax1 cytoplasmic fraction (marked by the white arrow) colocalized with GM130 (Golgi apparatus marker). As previously reported (35), Tax2 displayed a predominantly perinuclear localization with a low number of cells displaying nuclear speckles (see frequencies on the right). Contrary to Tax1, no overlay of Tax2 cytoplasmic signal with GM130 was observed. Thus, Tax2 cytoplasmic localization sharply differs from that of the cytoplasmic fraction of Tax1. Consistent with our previous report, the chimeric Tax1₁₋₉₀-2₉₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃ protein localization was similar to that of Tax2 ((35) and figure 6B), confirming that the domain encompassing Tax amino acids 91-113 is critical for Tax localization. We thus investigated the post-translational modification pattern of Tax1₁₋₉₀-2₉₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃, which only contains 22 Tax2 amino acids in its sequence (figure 6C). Interestingly, this chimeric protein was ubiquitinated and SUMOylated at levels similar to Tax1 (figure 6C (a) and (b) lane 3 vs 2). These results indicate that subcellular localization alone does not account for low levels of Tax2 ubiquitination and SUMOylation.

We then assessed the localization and post-translational modifications profiles of two other constructs: Tax2₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃ and Tax2₁₋₂₂₀-1₂₂₁₋₃₅₃. Consistent with the role of 90-113 sequence in the control of subcellular localization, and similarly to wild-type Tax2, Tax2₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃ and Tax2₁₋₂₂₀-1₂₂₁₋₃₅₃ were most predominantly found in

the cytoplasm and did not colocalize with GM130 (figure 6B, see frequencies on the right of the panel). However, ubiquitination of Tax2₁₋₂₂₀-1₂₂₁₋₃₅₃ was significantly reduced compared to that of Tax1 (figure 6C (a) lane 5 vs 2), while ubiquitination of Tax2₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃ was similar to that of Tax1 (lane 4 vs 2). These results demonstrate that amino acids 114-353 of Tax1 are sufficient for Tax ubiquitination and that amino acids 114-220 of Tax2 prevent Tax1 ubiquitination.

Conversely, SUMOylation of both Tax2₁₋₁₁₃-1₁₁₄₋₃₅₃, and Tax2₁₋₂₂₀-1₂₂₁₋₃₅₃ was similar to that of Tax1 (figure 6C (b) lanes 4 and 5 vs 1), indicating that the domain spanning amino acids 221-353 of Tax1 is sufficient for Tax SUMOylation and that the same domain of Tax2 prevents Tax1 SUMOylation. Control western blots demonstrated similar levels of purification for all constructs (figure 6C (c)). Control NF-κB-luc and HTLV-1-LTR-luc reporter gene assays performed in similar experimental settings confirm the functionality of all chimeras (figure 6D and E).

In conclusion, we have shown that (i) subcellular localization alone does not account for low levels of Tax2 ubiquitination and SUMOylation; (ii) Tax1 domain encompassing lysines K4 to K10 is sufficient to mediate Tax ubiquitination; (ii) Tax1 domain encompassing lysines K6 to K10 is sufficient to mediate Tax SUMOylation. This demonstrates that the amino acid context of the targeted lysine residues critically determines the ubiquitination and SUMOylation status of each Tax protein.

DISCUSSION

Our data show that Tax2 is barely conjugated to endogenous ubiquitin and SUMO in cells. Furthermore, we demonstrate that a lysineless Tax2 mutant that is intrinsically non-ubiquitinable and non-SUMOylable still significantly activates the NF- κ B pathway. These findings provide the first evidence that in contrast to Tax1, Tax2-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

Ubiquitination and SUMOylation of Tax1 have been extensively studied and shown to critically control its ability to activate NF- κ B, in part by affecting its subcellular localization (20, 30-32, 36). Using over-expressed ubiquitin or SUMO proteins and Ni-NTA pulldown experiments, a recent study reported that unlike Tax1, Tax2 is both ubiquitinated and SUMOylated (57). Differences in the pattern of Tax1 vs Tax2 ubiquitination and SUMOylation were however observed. In particular, lower levels of short modifications (mono-, di-ubiquitin and di- and tri- SUMO chains) were retrieved for Tax2 when compared to Tax1 (57). However, and more importantly, experiments using endogenous ubiquitin and SUMO proteins, which could thus prevent false-positive results, were not performed and the functional roles of those post-translational modifications were not assessed. One could indeed hypothesize that over-expressing ubiquitin leads to non-specific, uncontrolled biases (26). This is why all our experiments were performed using endogenous levels of both ubiquitin and SUMO proteins, and when possible endogenous levels of Tax. In addition, all our experiments included Tax1 as a control and Tax1 results were consistent with the literature.

Tax1 and Tax2 share approximately 78% of amino acid sequence identity. In particular, the lysine residues targeted by ubiquitination and SUMOylation (K4 to K8)

are conserved between the two proteins. This strongly suggests that barely detectable Tax2 ubiquitination and SUMOylation are not linked to the lack of targeted lysines but rather to the absence of other determinants allowing the interaction with the modification machineries. This conclusion is supported by our data showing that the Tax1 region encompassing the conserved ubiquitinated lysines (K4 to K10) confers ubiquitination to Tax2, while the Tax1 region encompassing the conserved SUMOylated lysines (K6 to K10) confers SUMOylation to Tax2. Hence, Tax1/Tax2 amino acid differences within these domains are likely to be responsible for the low level of Tax2 modification. Indeed, the 114-353 region of Tax1 and Tax2 displays 73 non-conserved amino acids (30%), while the 221-353 region displays 46 non-conserved amino acids (35%). Consistent with this model, we show here that over-expression of Ubc13 does not enhance Tax2 ubiquitination, contrarily to Tax1, indicating that the effect of Ubc13 distinguishes between Tax1 and Tax2. Interestingly, the 221-353 domain of Tax1 has previously been shown to contain key motifs that distinguish between Tax1 and Tax2 in the context of the activation of the non-canonical NF- κ B pathway (49), supporting the concept that cellular partners can differentiate Tax1 from Tax2. Whether observations from Shoji et al. are linked to Tax post-translational modifications should be further investigated.

Several E3 ubiquitin ligase families have been identified, including proteins that recognize motifs containing phosphorylated residues (17). Interestingly, the amino acid 114-353 region of Tax1 that confers ubiquitination to Tax2 contains a series of serine and threonine residues that are not conserved in Tax2 sequence. This notably includes S336 that is phosphorylated in Tax1 (11). In addition, the SLTTGAL (aa 199-205) sequence found in Tax1 but not in Tax2 fits with the consensus motif for phosphorylation by casein kinase 1 (CK1), a kinase shown to allow phosphorylation-

499 dependent ubiquitination of substrates (27). Further investigations are needed to
500 assess the role of these phosphorylated residues as well as other motifs of Tax in
501 differential Tax1 and Tax2 ubiquitination.

502 SUMOylation was reported to mainly occur on consensus motifs such as
503 ψ KxD/E (where ψ is a large hydrophobic residue) (59). Such a consensus motif is not
504 present in Tax1, although a "PKD" motif is located at position 262-264 encompassing
505 K6. Interestingly, this motif is changed into "PKA" in Tax2. Further experiments are
506 needed to determine whether this slight change in amino acid sequence accounts for
507 the differences observed between Tax1 and Tax2 SUMOylation.

508 Regulation of ubiquitination and SUMOylation was reported to be mediated by
509 cross talks between post-translational modifications. As an example, ubiquitination
510 and SUMOylation may act sequentially (59). We describe here one chimera that is
511 efficiently SUMOylated but weakly ubiquitinated. This result indicates that
512 ubiquitination of Tax might not be a prerequisite for Tax SUMOylation. Whether
513 SUMOylation is a prerequisite for Tax1 ubiquitination needs to be clarified.

514 Our results based on endogenously expressed ubiquitin and SUMO proteins
515 clearly demonstrate that the functions of each Tax protein are regulated through
516 distinct molecular mechanisms. Our results show that in sharp contrast with Tax1,
517 Tax2-mediated activation of NF- κ B involves a mechanism independent of the lysine
518 residues of Tax2, therefore of Tax2 conjugation to ubiquitin and SUMO. It is believed
519 that Tax1 contains at least one IKK γ /NEMO-binding domain, *i.e.* the leucine-rich
520 region located between amino acids 121-141 (60). However, Tax1 ubiquitination is
521 also required for Tax binding to IKK γ /NEMO (20, 36). Our results show that a
522 lysineless Tax2 mutant is still able to interact with IKK γ /NEMO. Hence, Tax2 /
523 IKK γ /NEMO interaction might either be direct, indicating that in contrast to Tax1, the

ubiquitin-independent Tax2 interaction with IKK γ /NEMO is sufficient, or it might be indirect. In the later case, this could suggest that Tax2 recruits an ubiquitinated partner that then allows recruitment of IKK γ /NEMO. This hypothesis is supported by our observation that over-expression of the deubiquitinase USP20 inhibits the activity of the non-ubiquitinable (and hence deubiquitinase-insensitive) Tax2-K0 mutant. The recent characterization of Tax2 interactome (50) and of its ubiquitinated partners will be of major interest in this matter. Whether the lack of requirement of Tax ubiquitination and SUMOylation for NF- κ B activation functionally impacts on the “quality” of the NF- κ B response (in terms of gene activation profile) should also be investigated and might eventually lead to new insights into HTLV-1 vs HTLV-2 distinct pathological outcomes.

In conclusion, our study reveals significant new differences between Tax1 and Tax2 and favors the notion that the molecular determinants involved in the activation of the NF- κ B pathway by Tax1 and Tax2 are not identical.

538 **CONFLICT OF INTEREST**

539 The authors declare no conflict of interest.

540

541 **ACKNOWLEDGEMENTS**

542 RM is supported by INSERM and by Ecole Normale Supérieure de Lyon. CJ is
543 supported by the Ecole Normale Supérieure de Lyon. The authors acknowledge the
544 support of ARC and of InCa (Cancéropôle CLARA). We wish to thank the PLATIM
545 imaging platform from the UMS3444.

546 We also thank E. Harhaj, K.T. Jeang and J. Yasunaga for the gift of plasmids. We
547 thank the different members of the Mahieux laboratory for their helpful suggestions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Tax2 activates the NF- κ B pathway despite low levels of conjugation to endogenous ubiquitin and SUMO.

(A) HTLV-2 transformed C19 T lymphocytes were mixed with CEM uninfected (HTLV negative) lymphocytes at a 1:10 ratio. Cells were stained with an anti-Tax2 antibody (green) and an anti-IKK γ /NEMO antibody (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 μ m.

(B) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or a Tax1-His- or Tax2-His-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean relative luciferase units (RLU) \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

(C) Schematic representation of Tax1 and Tax2 highlighting the positions of lysine residues in both proteins. Ten lysine residues are present in Tax1 (positions 85, 88, 111, 189, 197, 263, 280, 284, 324 and 346) and 13 in Tax2 (positions 88, 100, 111, 149, 185, 189, 197, 263, 280, 284, 323, 347 and 356). Lysines targeted by ubiquitination and SUMOylation are also indicated.

(D) HeLa cells were transfected with 2 μ g of an empty pSG5M vector, an untagged Tax1- (Irr), a Tax1-His- or a Tax2-His-encoding vector. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using (a) anti-ubiquitin or (b) anti-SUMO2/3 antibodies. (c) Levels of purification of Tax1-His and Tax2-His were determined by western blot using an anti-His antibody. See Materials and Methods for quantification method.

Figure 2. Tax2-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

(A) Schematic representation of wild-type Tax2 and Tax2-K0 mutant, in which all 13 lysine residues were mutated into arginine.

(B) HeLa cells were transfected with 2 μ g of wild-type or 4 μ g (to ensure equivalent expression levels) of lysineless Tax1 or Tax2-encoding vectors. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using (a) an anti-ubiquitin or (b) an anti-SUMO2/3 antibody. (c) Levels of purification of each Tax construct in purified extracts were determined by western blot using an anti-His antibody.

(C) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or with wild-type or lysineless Tax1-His- or Tax2-His-encoding vectors, as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in triplicate and is representative of 3 independent experiments. Results of t-tests are shown (*, $p < 0.05$; ns, non significant).

Figure 3. Tax2 activation of the IKK complex involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

(A) HeLa cells were transfected with 200 ng of wild-type or 400 ng of lysineless Tax1 or Tax2 vectors. Cells were stained with anti-His (green) and anti-IKK γ /NEMO antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 μ m. Enlargements are

shown in the “Merge” panel. The intensity of fluorescence for each staining along the line drawn on the enlarged merged images is plotted in the diagrams on the right.

(B) HeLa cells were transfected with 5 µg of Tax1-His-, Tax2-His- or Tax2-K0-His-encoding vectors, or 10 µg of Tax1-K0-His-encoding vectors, as indicated. Lysates were immunoprecipitated with an anti-His antibody and western blot analysis were performed using (a) anti-IKKγ/NEMO, (b) anti-His and (c) anti-phospho-IKK-α/β antibodies. Whole cell lysates were also blotted with the same antibodies (d to f). See Materials and Methods for quantification method.

Figure 4. Tax2-induced nuclear translocation of RelA/p65 involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

(A) HeLa cells were transfected with 200 ng of wild-type or 400 ng of lysineless Tax1 or Tax2 vectors, as indicated. Twenty-four hours later, cells were fixed and stained with anti-His (green) and anti-RelA/p65 antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 µm. Arrows indicate nuclei in which translocation of RelA/p65 is observed. Arrow heads indicate basal level of RelA/p65 translocation in nuclei of Tax-negative cells or Tax1-K0-expressing cells.

(B) Nuclei visualized as in (A) were delineated using Image J software and mean brightness of the RelA/p65 staining was calculated. Values obtained for non-transfected cells were then subtracted from those for Tax-expressing cells in the same field. Tax-induced increase in RelA/p65 nuclear signal intensity is plotted.

Figure 5. USP20 deubiquitinase exerts effects on Tax2-mediated NF-κB activation that are independent of Tax2 conjugation to ubiquitin.

293T cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or Tax1-His- or Tax2-His-encoding vectors in the absence (+ empty vector) or presence (+ USP20) of an USP20-encoding vector (500 ng and 1 μ g) as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 2 independent experiments.

Figure 6. Domains encompassing K4-10 and K6-10 are sufficient for Tax1 ubiquitination and SUMOylation, respectively.

(A) Schematic representation of the Tax1/Tax2 chimeras used in (B, C and D). The table summarizes the results of (C): Tax ubiquitination ("Ub" column) and SUMOylation ("SUMO2/3" column) status is indicated as + (>100% relative intensity compared to Tax1), - (<10% relative intensity compared to Tax1).

(B) HeLa cells were transfected with 400 ng of the indicated plasmids. Cells were stained with anti-His (green) and anti-GM130 antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Arrows point to the cytoplasmic fraction of Tax1. Scale bar: 10 μ m. The percentage of cells containing cytoplasmic Tax (C), Tax nuclear speckles (NS), or both cytoplasmic Tax and Tax nuclear speckles (C+NS) is indicated. At least 100 cells were analyzed in each condition.

(C) HeLa cells were transfected with 2 μ g of the indicated vectors. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using (a) an anti-ubiquitin or (b) an anti-SUMO2/3 antibody, as indicated. (c) Levels of purification of each Tax construct were determined by western blot using an anti-His antibody. See Materials and Methods

for quantification method.

(D) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or the indicated chimeric Tax1/2-His-encoding vectors or the Tax1-K0-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

(E) HeLa cells were transfected with an HTLV1-LTR-luc construct together with either an empty vector or the indicated chimeric Tax1/2-His-encoding vectors or the Tax1-K0-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

REFERENCES

1. Alefantis, T., K. Barmak, E. W. Harhaj, C. Grant, and B. Wigdahl. 2003. Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J Biol Chem* 278:21814-22.
2. Anonymous. 1988. The third nation-wide study on adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: characteristic patterns of HLA antigen and HTLV-I infection in ATL patients and their relatives. The T- and B-cell Malignancy Study Group. *Int J Cancer* 41:505-12.
3. Avesani, F., M. G. Romanelli, M. Turci, G. Di Gennaro, C. Sampaio, C. Bidoia, U. Bertazzoni, and F. Bex. 2010. Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Virology* 408:39-48.
4. Bertazzoni, U., M. Turci, F. Avesani, G. Di Gennaro, C. Bidoia, and M. G. Romanelli. 2011. Intracellular Localization and Cellular Factors Interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax Proteins: Similarities and Functional Differences. *Viruses* 3:541-60.
5. Bex, F., A. McDowall, A. Burny, and R. Gaynor. 1997. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol* 71:3484-97.
6. Bex, F., M. J. Yin, A. Burny, and R. B. Gaynor. 1998. Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol* 18:2392-405.

- 683 7. Burton, M., C. D. Upadhyaya, B. Maier, T. J. Hope, and O. J. Semmes. 2000.
684 Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete
685 subcellular targets. *J Virol* 74:2351-64.
- 686 8. Chevalier, S. A., L. Meertens, S. Calattini, A. Gessain, L. Kiemer, and R.
687 Mahieux. 2005. Presence of a functional but dispensable nuclear export signal
688 in the HTLV-2 Tax protein. *Retrovirology* 2:70.
- 689 9. Chiari, E., I. Lamsoul, J. Lodewick, C. Chopin, F. Bex, and C. Pique. 2004.
690 Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for
691 proteasome binding. *J Virol* 78:11823-32.
- 692 10. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C.
693 Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by
694 TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique
695 polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-61.
- 696 11. Durkin, S. S., M. D. Ward, K. A. Fryrear, and O. J. Semmes. 2006. Site-
697 specific phosphorylation differentiates active from inactive forms of the human
698 T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein. *J Biol Chem* 281:31705-12.
- 699 12. Endo, K., A. Hirata, K. Iwai, M. Sakurai, M. Fukushi, M. Oie, M. Higuchi, W. W.
700 Hall, F. Gejyo, and M. Fujii. 2002. Human T-cell leukemia virus type 2 (HTLV-
701 2) Tax protein transforms a rat fibroblast cell line but less efficiently than
702 HTLV-1 Tax. *J Virol* 76:2648-53.
- 703 13. Felber, B. K., H. Paskalis, C. Kleinman-Ewing, F. Wong-Staal, and G. N.
704 Pavlakis. 1985. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its
705 long terminal repeats. *Science* 229:675-9.
- 706 14. Feuer, G., and P. L. Green. 2005. Comparative biology of human T-cell
707 lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24:5996-6004.
- 708 15. Fryrear, K. A., X. Guo, O. Kerscher, and O. J. Semmes. 2011. The SUMO-
709 targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the
710 HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood*.
- 711 16. Fu, J., Z. Qu, P. Yan, C. Ishikawa, R. I. Aqeilan, A. B. Rabson, and G. Xiao.
712 2011. The tumor suppressor gene WWOX links the canonical and
713 noncanonical NF- κ B pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis.
714 *Blood* 117:1652-61.
- 715 17. Gao, M., and M. Karin. 2005. Regulating the regulators: control of protein
716 ubiquitination and ubiquitin-like modifications by extracellular stimuli. *Mol Cell*
717 19:581-93.
- 718 18. Gatza, M. L., T. Dayaram, and S. J. Marriott. 2007. Ubiquitination of HTLV-I
719 Tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and
720 nuclear export. *Retrovirology* 4:95.
- 721 19. Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G.
722 de The. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with
723 tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407-10.
- 724 20. Harhaj, N. S., S. C. Sun, and E. W. Harhaj. 2007. Activation of NF- κ B by
725 the human T cell leukemia virus type I Tax oncoprotein is associated with
726 ubiquitin-dependent relocalization of I κ B kinase. *J Biol Chem* 282:4185-
727 92.
- 728 21. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF- κ B
729 signaling. *Cell* 132:344-62.
- 730 22. Higuchi, M., and M. Fujii. 2009. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-
731 2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* 6:117.

- 732 23. Higuchi, M., C. Tsubata, R. Kondo, S. Yoshida, M. Takahashi, M. Oie, Y.
733 Tanaka, R. Mahieux, M. Matsuoka, and M. Fujii. 2007. Cooperation of NF-
734 kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human
735 T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for
736 interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line. *J Virol*
737 81:11900-7.
- 738 24. Hirata, A., M. Higuchi, A. Niinuma, M. Ohashi, M. Fukushi, M. Oie, T.
739 Akiyama, Y. Tanaka, F. Gejyo, and M. Fujii. 2004. PDZ domain-binding motif
740 of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the
741 transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* 318:327-36.
- 742 25. Hjelle, B., O. Appenzeller, R. Mills, S. Alexander, N. Torrez-Martinez, R.
743 Jahnke, and G. Ross. 1992. Chronic neurodegenerative disease associated
744 with HTLV-II infection. *Lancet* 339:645-6.
- 745 26. Hjerpe, R., and M. S. Rodriguez. 2008. Efficient approaches for characterizing
746 ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans* 36:823-7.
- 747 27. Inuzuka, H., A. Tseng, D. Gao, B. Zhai, Q. Zhang, S. Shaik, L. Wan, X. L. Ang,
748 C. Mock, H. Yin, J. M. Stommel, S. Gygi, G. Lahav, J. Asara, Z. X. Xiao, W. G.
749 Kaelin, Jr., J. W. Harper, and W. Wei. 2010. Phosphorylation by casein kinase
750 I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP)
751 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 18:147-59.
- 752 28. Jacobson, S., T. Lehky, M. Nishimura, S. Robinson, D. E. McFarlin, and S.
753 Dhib-Jalbut. 1993. Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive
754 neurological disease clinically indistinguishable from HTLV-I-associated
755 myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 33:392-6.
- 756 29. Journo, C., E. Douceron, and R. Mahieux. 2009. HTLV gene regulation:
757 because size matters, transcription is not enough. *Future Microbiol* 4:425-40.
- 758 30. Kfoury, Y., R. Nasr, A. Favre-Bonvin, M. El-Sabban, N. Renault, M. L. Giron,
759 N. Setterblad, H. E. Hajj, E. Chiari, A. G. Mikati, O. Hermine, A. Saib, H. de
760 The, C. Pique, and A. Bazarbachi. 2008. Ubiquitylated Tax targets and binds
761 the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27:1665-76.
- 762 31. Kfoury, Y., N. Setterblad, M. El-Sabban, A. Zamborlini, Z. Dassouki, H. El Hajj,
763 O. Hermine, C. Pique, H. de The, A. Saib, and A. Bazarbachi. 2011. Tax
764 ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and
765 NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 117:190-9.
- 766 32. Lamsoul, I., J. Lodewick, S. Lebrun, R. Brasseur, A. Burny, R. B. Gaynor, and
767 F. Bex. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine
768 residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus
769 tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 25:10391-406.
- 770 33. Lodewick, J., I. Lamsoul, and F. Bex. 2011. Move or Die: the Fate of the Tax
771 Oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* 3:829-57.
- 772 34. Luo, J. L., H. Kamata, and M. Karin. 2005. The anti-death machinery in
773 IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol* 25:541-50.
- 774 35. Meertens, L., S. Chevalier, R. Weil, A. Gessain, and R. Mahieux. 2004. A 10-
775 amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax
776 protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J*
777 *Biol Chem* 279:43307-20.
- 778 36. Nasr, R., E. Chiari, M. El-Sabban, R. Mahieux, Y. Kfoury, M. Abdulhay, V.
779 Yazbeck, O. Hermine, H. de The, C. Pique, and A. Bazarbachi. 2006. Tax
780 ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of
781 NF-kappaB activation. *Blood* 107:4021-9.

782 37. Nejmeddine, M., A. L. Barnard, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham.
783 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule
784 reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* 280:29653-60.

785 38. Nicot, C., F. Tie, and C. Z. Giam. 1998. Cytoplasmic forms of human T-cell
786 leukemia virus type 1 Tax induce NF-kappaB activation. *J Virol* 72:6777-84.

787 39. Oeckinghaus, A., M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2011. Crosstalk in NF-kappaB
788 signaling pathways. *Nat Immunol* 12:695-708.

789 40. Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto,
790 and M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity.
791 *Lancet* 1:1031-2.

792 41. Peloponese, J. M., Jr., H. Iha, V. R. Yedavalli, A. Miyazato, Y. Li, K. Haller, M.
793 Benkirane, and K. T. Jeang. 2004. Ubiquitination of human T-cell leukemia
794 virus type 1 tax modulates its activity. *J Virol* 78:11686-95.

795 42. Ross, T. M., A. C. Minella, Z. Y. Fang, S. M. Pettiford, and P. L. Green. 1997.
796 Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax. *J Virol*
797 71:8912-7.

798 43. Ross, T. M., M. Narayan, Z. Y. Fang, A. C. Minella, and P. L. Green. 2000.
799 Human T-cell leukemia virus type 2 tax mutants that selectively abrogate
800 NFkappaB or CREB/ATF activation fail to transform primary human T cells. *J*
801 *Virol* 74:2655-62.

802 44. Semmes, O. J., and K. T. Jeang. 1996. Localization of human T-cell leukemia
803 virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin
804 speckles. *J Virol* 70:6347-57.

805 45. Semmes, O. J., F. Majone, C. Cantemir, L. Turchetto, B. Hjelle, and K. T.
806 Jeang. 1996. HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei
807 in cells and transcriptional activation of viral LTRs. *Virology* 217:373-9.

808 46. Sheehy, N., L. Lillis, K. Watters, M. Lewis, V. Gautier, and W. Hall. 2006.
809 Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins.
810 *Retrovirology* 3:20.

811 47. Shembade, N., and E. W. Harhaj. 2010. Role of post-translational
812 modifications of HTLV-1 Tax in NF-kappaB activation. *World J Biol Chem*
813 1:13-20.

814 48. Shembade, N., N. S. Harhaj, M. Yamamoto, S. Akira, and E. W. Harhaj. 2007.
815 The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the
816 ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J Virol*
817 81:13735-42.

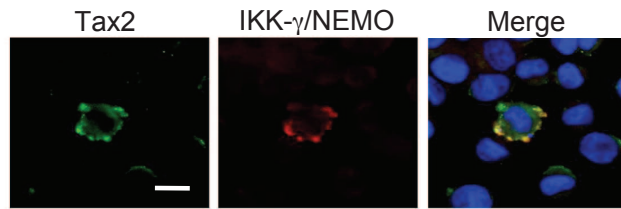
818 49. Shoji, T., M. Higuchi, R. Kondo, M. Takahashi, M. Oie, Y. Tanaka, Y. Aoyagi,
819 and M. Fujii. 2009. Identification of a novel motif responsible for the distinctive
820 transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1
821 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology* 6:83.

822 50. Simonis, N., J. F. Rual, I. Lemmens, M. Boxus, T. Hirozane-Kishikawa, J. S.
823 Gatot, A. Dricot, T. Hao, D. Vertommen, S. Legros, S. Daakour, N. Klitgord, M.
824 Martin, J. F. Willaert, F. Dequiedt, V. Navratil, M. E. Cusick, A. Burny, C. Van
825 Lint, D. E. Hill, J. Tavernier, R. Kettmann, M. Vidal, and J. C. Twizere. 2012.
826 Host-pathogen interactome mapping for HTLV-1 and 2 retroviruses.
827 *Retrovirology* 9:26.

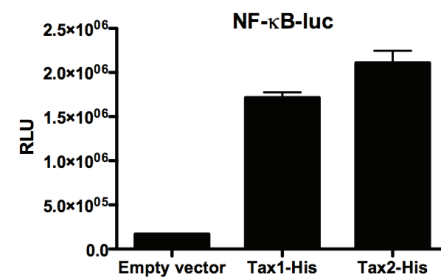
828 51. Slamon, D. J., W. J. Boyle, D. E. Keith, M. F. Press, D. W. Golde, and L. M.
829 Souza. 1988. Subnuclear localization of the trans-activating protein of human
830 T-cell leukemia virus type I. *J Virol* 62:680-6.

- 831 52. Smith, M. R., and W. C. Greene. 1990. Identification of HTLV-I tax trans-
832 activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev*
833 4:1875-85.
- 834 53. Sun, S. C., and S. Yamaoka. 2005. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and
835 implications for cell transformation. *Oncogene* 24:5952-64.
- 836 54. Takatsuki, T. 1977. Adult T-cell leukemia in Japan, p. 73-77. *In* T. S. Seno S,
837 Irino S (ed.), *Topics in Hematology*. Excerpta Medica, Amsterdam.
- 838 55. Tripp, A., P. Banerjee, M. Sieburg, V. Planelles, F. Li, and G. Feuer. 2005.
839 Induction of cell cycle arrest by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax in
840 hematopoietic progenitor (CD34+) cells: modulation of p21cip1/waf1 and
841 p27kip1 expression. *J Virol* 79:14069-78.
- 842 56. Tripp, A., Y. Liu, M. Sieburg, J. Montalbano, S. Wrzesinski, and G. Feuer.
843 2003. Human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein suppression of
844 multilineage hematopoiesis of CD34+ cells in vitro. *J Virol* 77:12152-64.
- 845 57. Turci, M., J. Lodewick, P. Righi, A. Polania, M. G. Romanelli, F. Bex, and U.
846 Bertazzoni. 2009. HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and
847 sumoylation and displays intracellular localization similar to its homologue
848 HTLV-1 Tax. *Virology*.
- 849 58. Turci, M., M. G. Romanelli, P. Lorenzi, P. Righi, and U. Bertazzoni. 2006.
850 Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is
851 dependent upon a nuclear localization determinant in the N-terminal region.
852 *Gene* 365:119-24.
- 853 59. Wilkinson, K. A., and J. M. Henley. 2010. Mechanisms, regulation and
854 consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428:133-45.
- 855 60. Xiao, G., E. W. Harhaj, and S. C. Sun. 2000. Domain-specific interaction with
856 the I kappa B kinase (IKK)regulatory subunit IKK gamma is an essential step
857 in tax-mediated activation of IKK. *J Biol Chem* 275:34060-7.
- 858 61. Yamamoto, K., T. Ishida, K. Nakano, M. Yamagishi, T. Yamochi, Y. Tanaka,
859 Y. Furukawa, Y. Nakamura, and T. Watanabe. 2011. SMYD3 interacts with
860 HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci* 102:260-
861 6.
- 862 62. Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E.
863 Kirk, R. J. Kay, and A. Israel. 1998. Complementation cloning of NEMO, a
864 component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation.
865 *Cell* 93:1231-40.
- 866 63. Yan, P., J. Fu, Z. Qu, S. Li, T. Tanaka, M. J. Grusby, and G. Xiao. 2009.
867 PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated
868 tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal
869 degradation. *Blood* 113:4370-80.
- 870 64. Yasunaga, J., F. C. Lin, X. Lu, and K. T. Jeang. 2011. Ubiquitin-specific
871 peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to
872 negatively regulate NF-kappaB signaling. *J Virol* 85:6212-9.

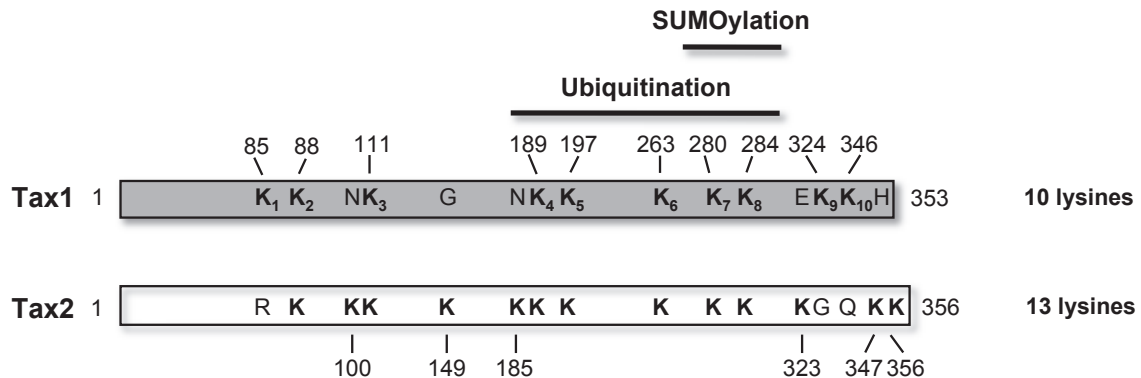
A. HTLV-2-infected C19 cells



B.



C.



D.

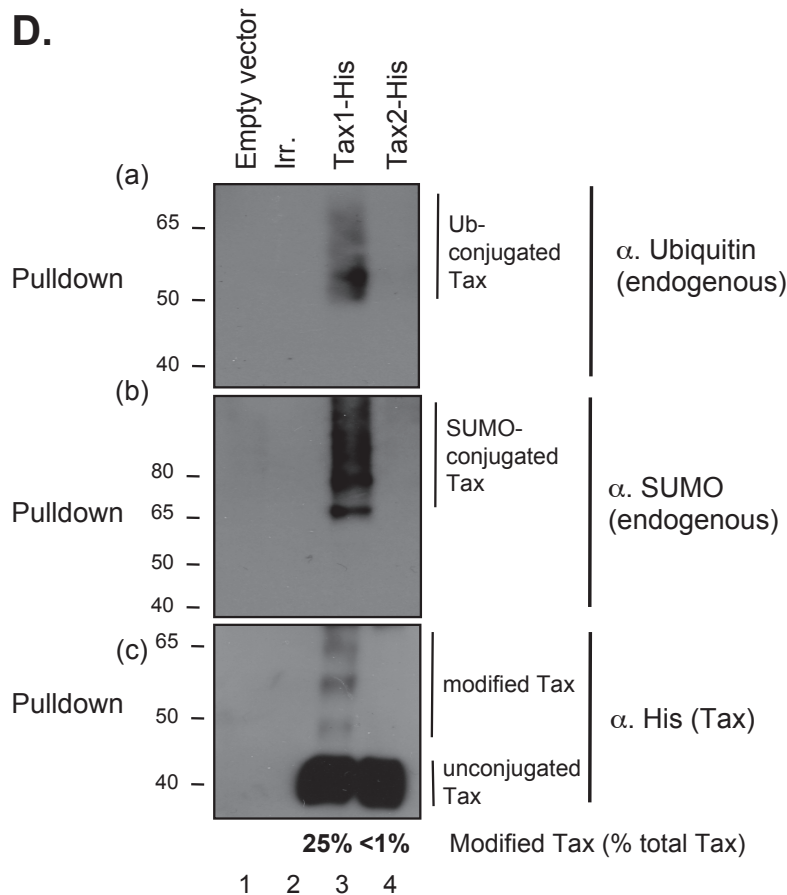


Figure 1. Tax2 activates the NF-κB pathway despite low levels of conjugation to endogenous ubiquitin and SUMO.

(A) HTLV-2 transformed C19 T lymphocytes cells were mixed with CEM uninfected (HTLV negative) lymphocytes at a 1:10 ratio. Cells were stained with an anti-Tax2 antibody (green) and an anti-IKKγ/NEMO antibody (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 μm.

(B) HeLa cells were transfected with an NF-κB-luc construct together with either an empty vector or a Tax1-His- or Tax2-His-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean relative luciferase units (RLU) ± SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

(C) Schematic representation of Tax1 and Tax2 highlighting the positions of lysine residues in both proteins. Ten lysine residues are present in Tax1 (positions 85, 88, 111, 189, 197, 263, 280, 284, 324 and 346) and 13 in Tax2 (positions 88, 100, 111, 149, 185, 189, 197, 263, 280, 284, 323, 347 and 356).

(D) HeLa cells were transfected with 2 μg of an empty pSG5M vector, an untagged Tax1- (Irr), a Tax1-His- or a Tax2-His-encoding vector. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using (a) anti-ubiquitin or (b) anti-SUMO2/3 antibodies. (c) Levels of purification of Tax1-His and Tax2-His were determined by western blot using an anti-His antibody. See Materials and Methods for quantification method.

		88	100	111	149	185	189	197	263	280	284	323	347	356		
		\		/		\		/		\	/		\	/		
Tax2	1	<div> <div> <div>K</div> <div>KK</div> <div>K</div> <div>KK</div> <div>K</div> <div>K</div> <div>K</div> <div>K</div> <div>K</div> <div>K</div> <div>KK</div> </div> </div>													356	13 lysines
x2-K0	1	<div> <div>R</div> <div>RR</div> <div>R</div> <div>RR</div> <div>R</div> <div>R</div> <div>R</div> <div>R</div> <div>R</div> <div>R</div> <div>RR</div> </div>													356	0 lysine

Western blot analysis showing the ubiquitination of Tax1 and Tax2, and the SUMOylation of Tax1. The blots are labeled (a), (b), and (c) on the left. The lanes are labeled at the top: Irr., Tax1-His, Tax1-K0-His, Tax2-His, and Tax2-K0-His. Molecular weight markers are indicated on the left of each blot. The right side of each blot is labeled with the antibody used: α. Ubiquitin for (a), α. SUMO 2/3 for (b), and α. His (Tax) for (c).

(a) α. Ubiquitin: Shows ubiquitination of Tax1 and Tax2. Tax1-His shows a prominent band at approximately 65 kDa. Tax1-K0-His shows a band at approximately 50 kDa. Tax2-His and Tax2-K0-His show bands at approximately 40 kDa.

(b) α. SUMO 2/3: Shows SUMOylation of Tax1. Tax1-His shows a band at approximately 80 kDa. Tax1-K0-His shows a band at approximately 65 kDa. Tax2-His and Tax2-K0-His show bands at approximately 50 kDa.

(c) α. His (Tax): Shows the expression of Tax1 and Tax2. Tax1-His, Tax1-K0-His, Tax2-His, and Tax2-K0-His all show bands at approximately 40 kDa.

NF- κ B-luc

* ($p=0.0153$)

ns ($p=0.0790$)

RLU

3 $\times 10^6$

2 $\times 10^6$

1 $\times 10^6$

0

Empty vector

Tax1-His

Tax1-K0-His

Tax2-His

Tax2-K0-His

Construct	RLU (approx.)	Significance
Empty vector	~0.3 $\times 10^6$	-
Tax1-His	~1.2 $\times 10^6$	* ($p=0.0153$)
Tax1-K0-His	~0.2 $\times 10^6$	ns ($p=0.0790$)
Tax2-His	~1.5 $\times 10^6$	* ($p=0.0153$)
Tax2-K0-His	~0.9 $\times 10^6$	ns ($p=0.0790$)

(C) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or with wild-type or lysineless Tax1-His- or Tax2-His-encoding vectors, as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in triplicate and is representative of 3 independent experiments. Results of t-tests are shown (*, $p < 0.05$; ns, non significant).

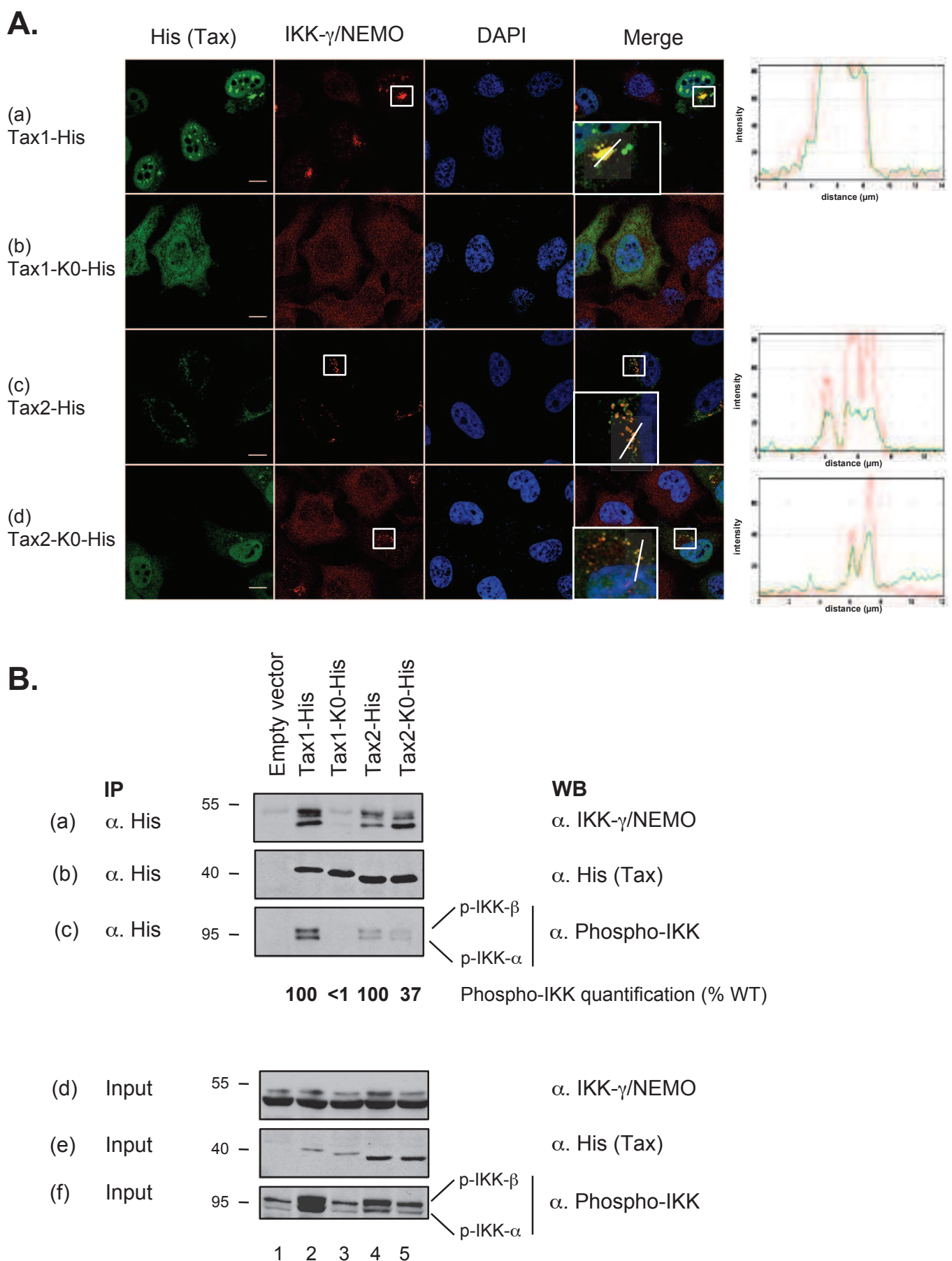


Figure 3. Tax2 activation of the IKK complex involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

(A) HeLa cells were transfected with 200 ng of wild-type or 400 ng of lysineless Tax1 or Tax2 vectors. Cells were stained with anti-His (green) and anti-IKK γ /NEMO antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 μ m. Enlargements are shown in the "Merge" panel. The intensity of fluorescence for each staining along the line drawn on the enlarged merged images is plotted in the diagrams on the right.

(B) HeLa cells were transfected with 5 μ g of Tax1-His-, Tax2-His- or Tax2-K0-His-encoding vectors, or 10 μ g of Tax1-K0-His-encoding vectors, as indicated. Lysates were immunoprecipitated with an anti-His antibody and western blot analysis were performed using (a) anti-IKK γ /NEMO, (b) anti-His and (c) anti-phospho-IKK- α/β antibodies. Whole cell lysates were also blotted with the same antibodies (d to f). See Materials and Methods for quantification method.

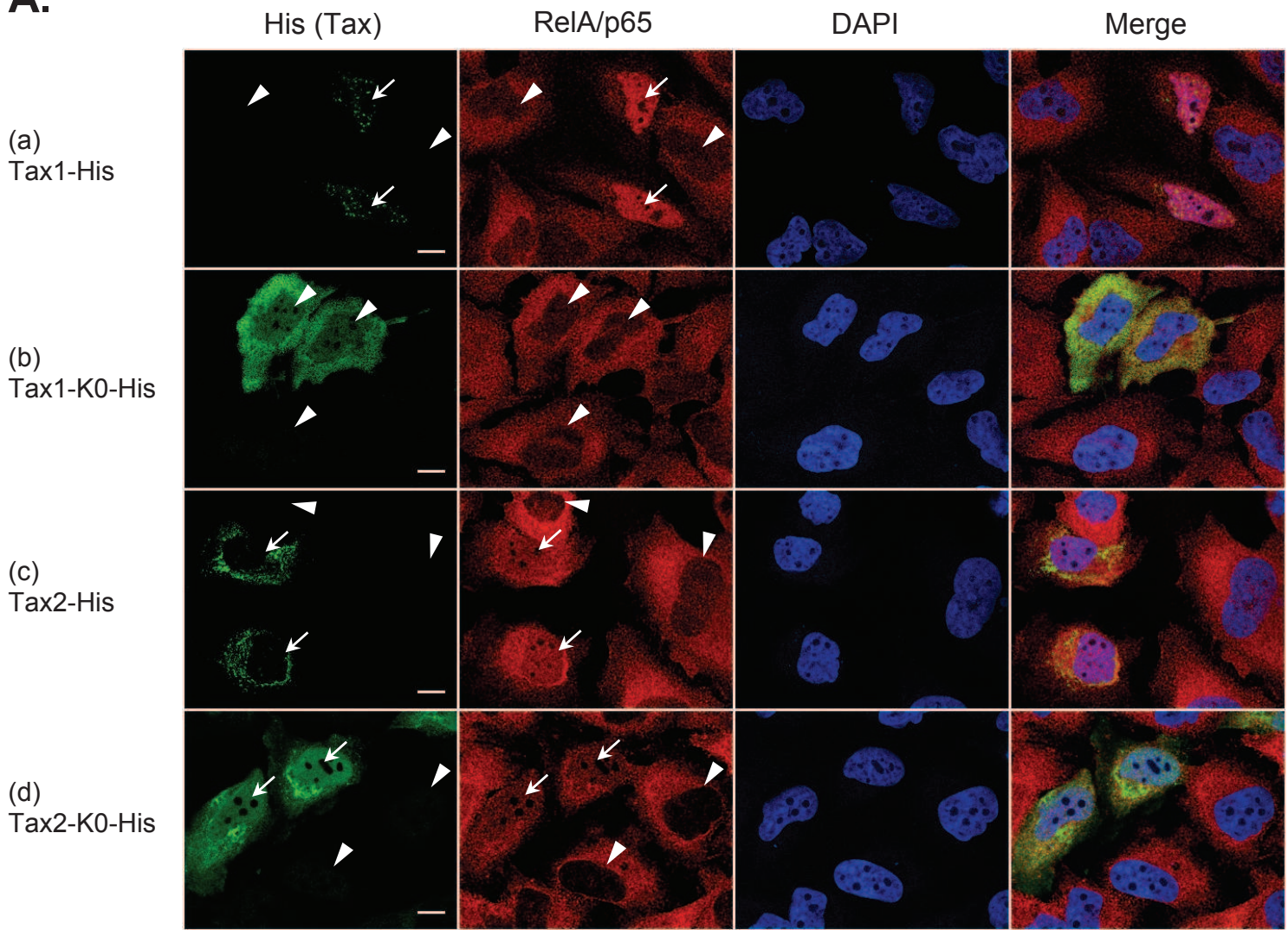
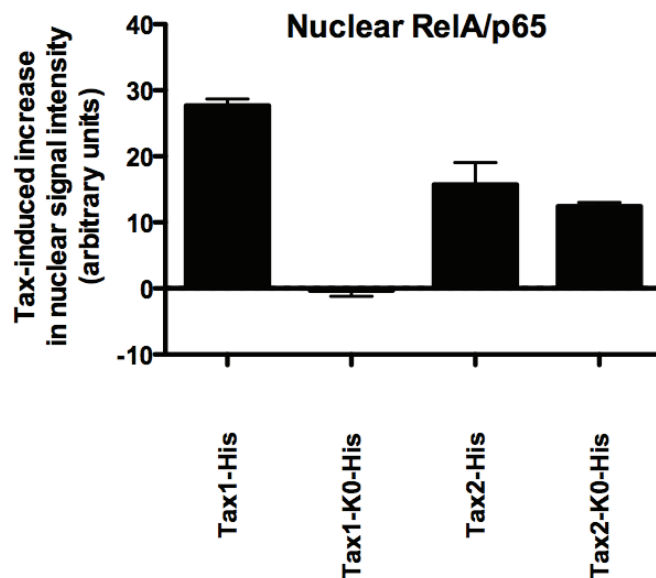
A.**B.**

Figure 4. Tax2-induced nuclear translocation of RelA/p65 involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO.

(A) HeLa cells were transfected with 200 ng of wild-type or 400 ng of lysineless Tax1 or Tax2 vectors, as indicated. Twenty-four hours later, cells were fixed and stained with anti-His (green) and anti-RelA/p65 antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Scale bar: 10 μ m. Arrows indicate nuclei in which translocation of RelA/p65 is observed. Arrow heads indicate basal level of RelA/p65 translocation in nuclei of Tax-negative cells or Tax1-K0-expressing cells.

(B) Nuclei visualized as in (A) were delineated using Image J software and mean brightness of the RelA/p65 staining was calculated. Values obtained for non-transfected cells were then subtracted from those for Tax-expressing cells in the same field. Tax-induced increase in RelA/p65 nuclear signal intensity is plotted.

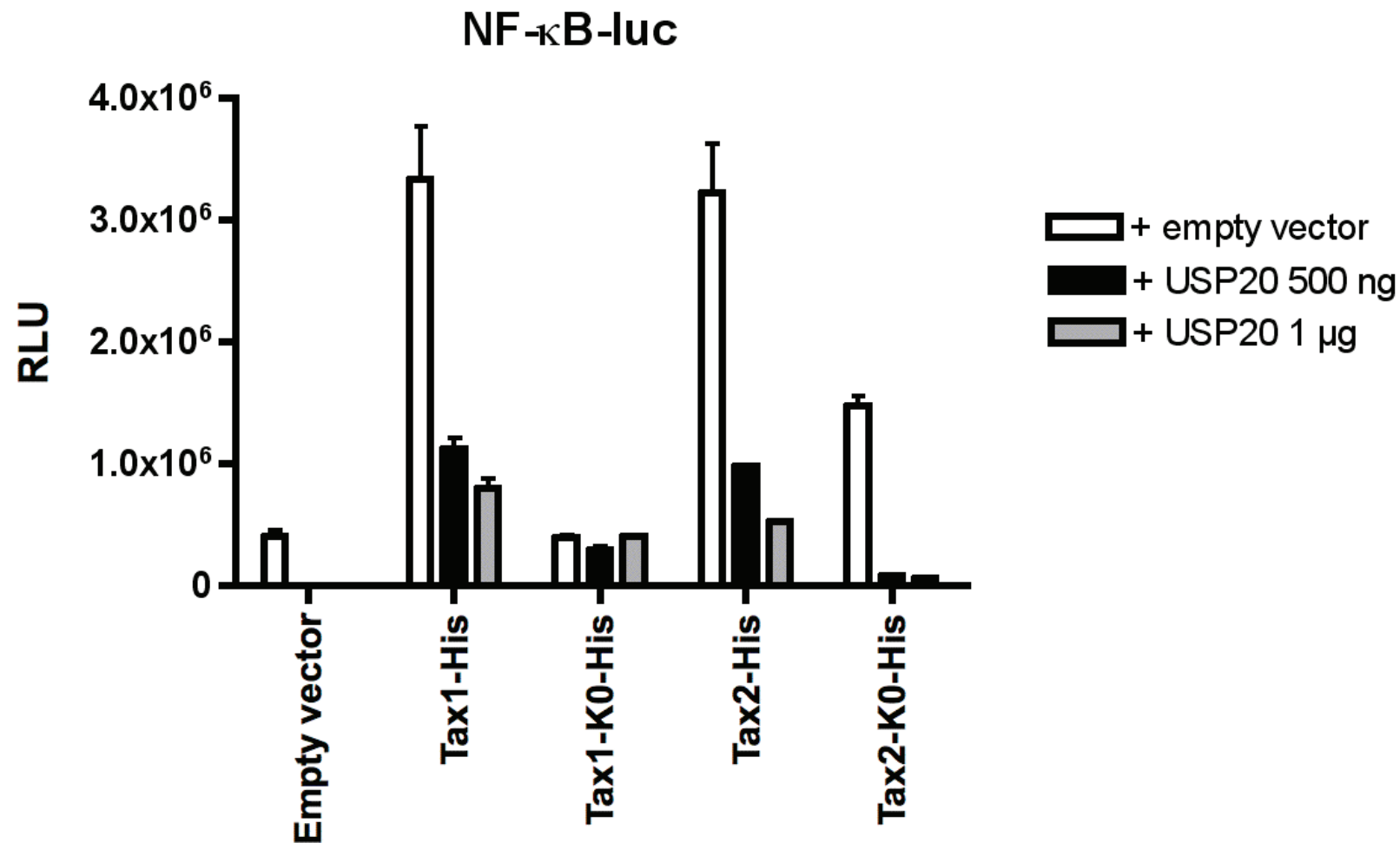


Figure 5. USP20 deubiquitinase exerts effects on Tax2-mediated NF- κ B activation that are independent of Tax2 conjugation to ubiquitin.

293T cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or Tax1-His- or Tax2-His-encoding vectors in the absence (+ empty vector) or presence (+ USP20) of an USP20-encoding vector (500 ng and 1 μ g) as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 2 independent experiments.

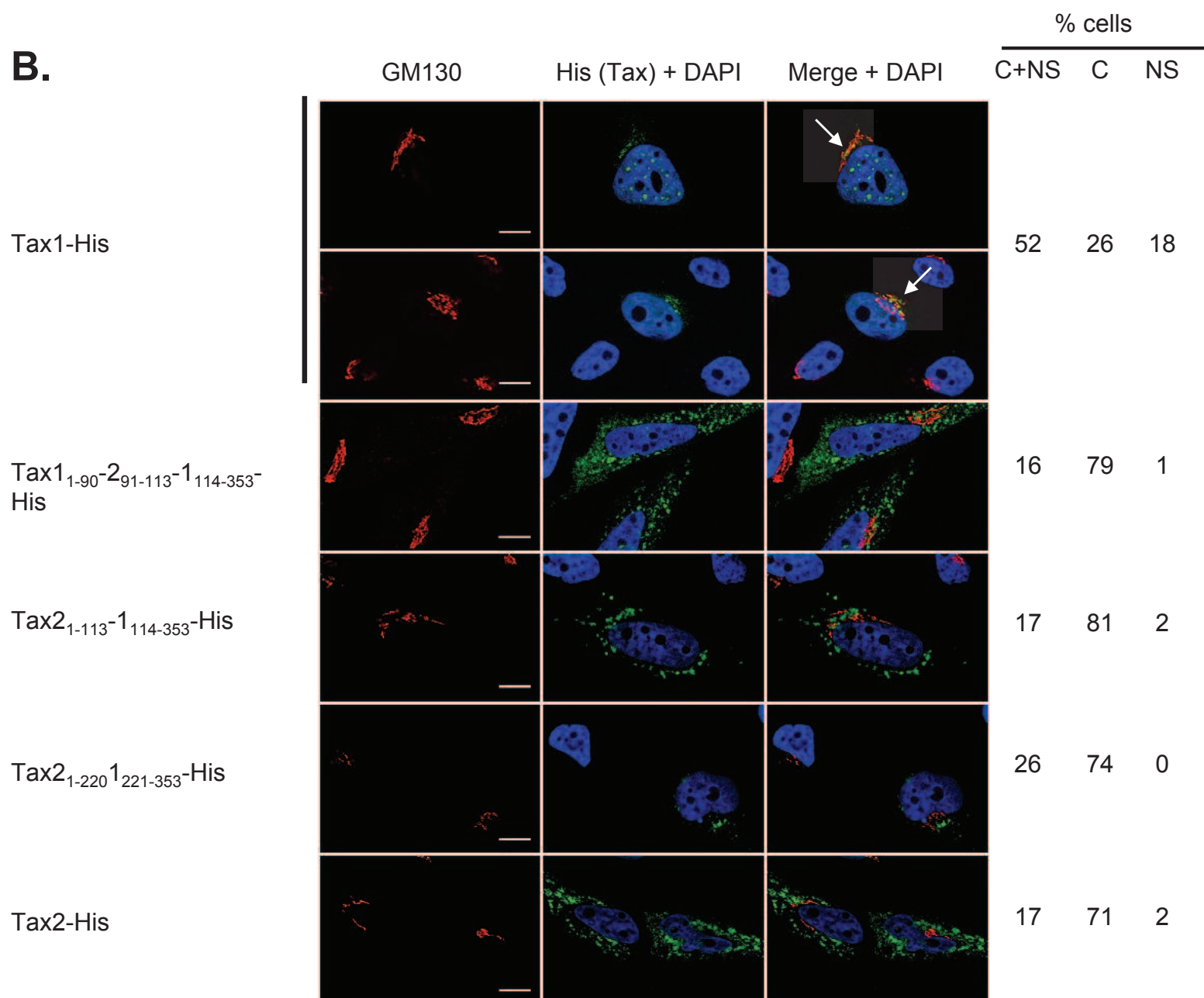
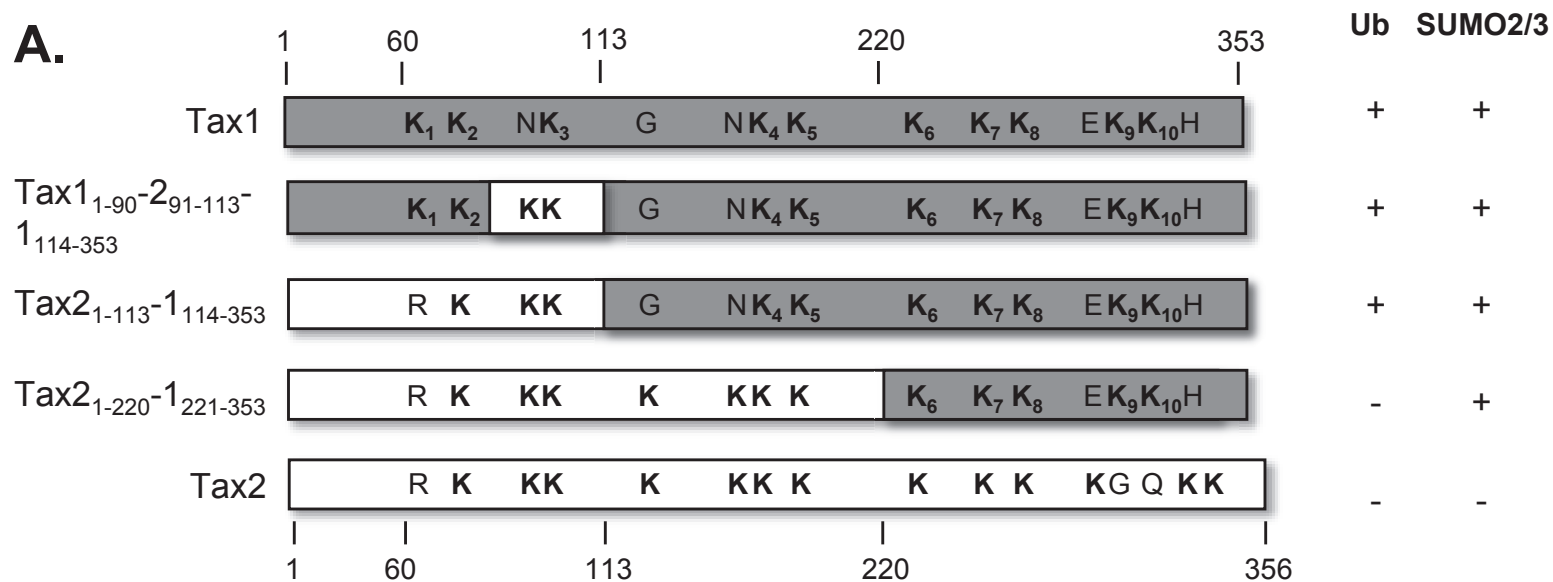


Figure 6 panels A and B (see next page for legend)

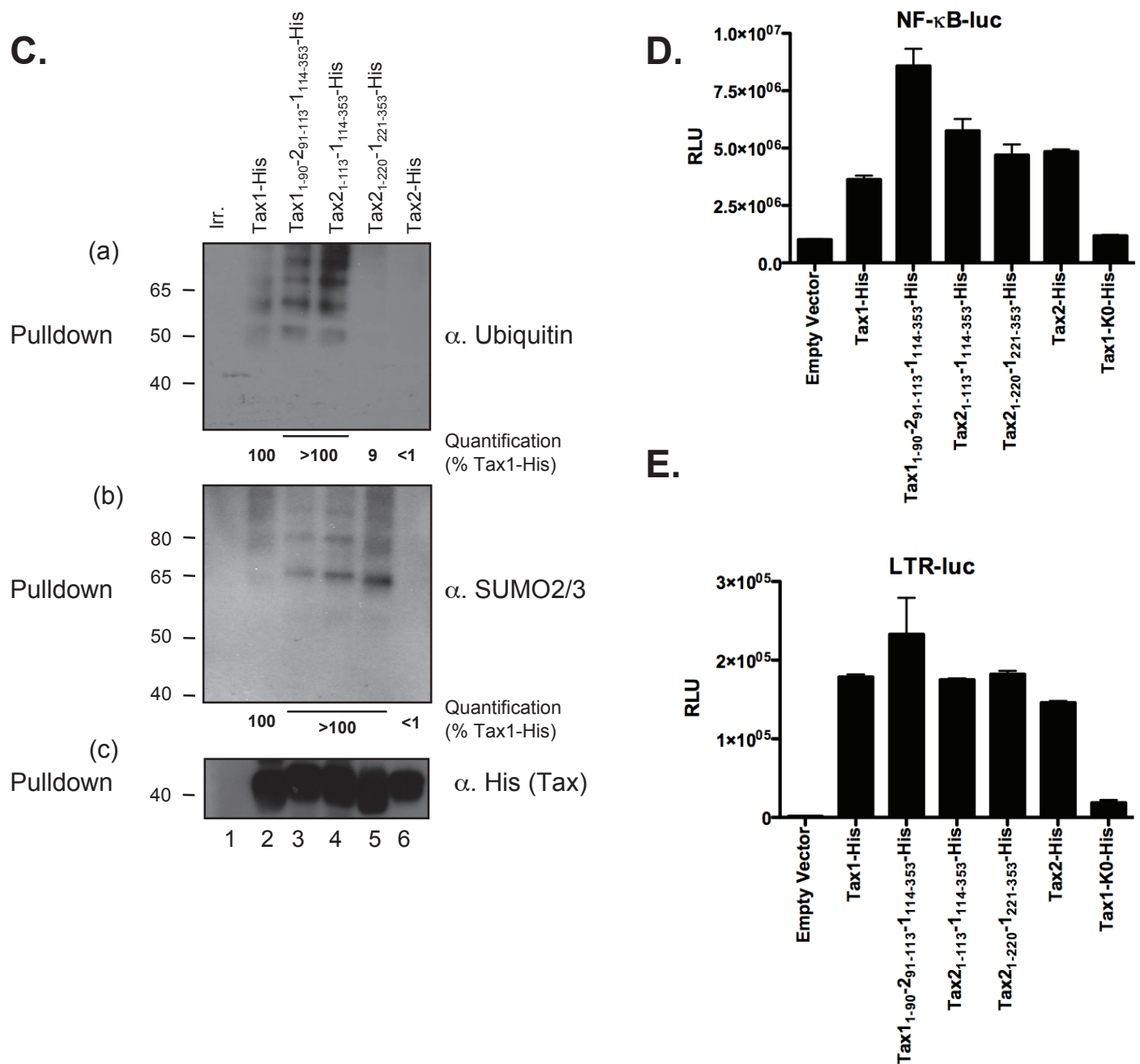


Figure 6. Domains encompassing K4-10 and K6-10 are sufficient for Tax1 ubiquitination and SUMOylation, respectively.

(A) Schematic representation of the Tax1/Tax2 chimeras used in (B, C and D). The table summarizes the results of (C): Tax ubiquitination (“Ub” column) and SUMOylation (“SUMO2/3” column) status is indicated as + (>100% relative intensity compared to Tax1), - (<10% relative intensity compared to Tax1).

(B) HeLa cells were transfected with 400 ng of the indicated plasmids. Cells were stained with anti-His (green) and anti-GM130 antibodies (red). Nuclei were stained using DAPI (blue). Cells were observed as described in the Materials and Methods section. Arrows point to the cytoplasmic fraction of Tax1. Scale bar: 10 μ m. The percentage of cells containing cytoplasmic Tax (C), Tax nuclear speckles (NS), or both cytoplasmic Tax and Tax nuclear speckles (C+NS) is indicated. At least 100 cells were analyzed in each condition.

(C) HeLa cells were transfected with 2 μ g of the indicated vectors. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using (a) an anti-ubiquitin or (b) an anti-SUMO2/3 antibody, as indicated. (c) Levels of purification of each Tax construct were determined by western blot using an anti-His antibody. See Materials and Methods for quantification method.

(D) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either an empty vector or the indicated chimeric Tax1/2-His-encoding vectors or the Tax1-K0-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

(E) HeLa cells were transfected with an HTLV1-LTR-luc construct together with either an empty vector or the indicated chimeric Tax1/2-His-encoding vectors or the Tax1-K0-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

Mutation	Forward primer sequence
K88A	CCCAGAGAACCTCAAGGACCCTCAGGGTCCTTACCCCTCCCACC
K100A	CCACTCCTGTCTCCCCCAGGGTTCCACCTGCC
K111A	CTTCTTTCAATCAATGCGAAGGCACACCCCTACCGAAATGG
K149A	CCAAAACATCTACACCACCTGGGGAAGAACCGTAGTATGCCTATACC
K185A, K189A	GAGCCTTCCTCACCAGGGTGCCTCTAAGACGATTAGAAGAAGCTTC
K197A	CGATTAGAAGAAGCTTCTATACAGAATGTTCTACACACAGGGG
K263A	CCGGCCCTTGCCCCAGAGCAGGGCAGCC
K280A, K284A	CTCTATTAATCTTCGAAAGATTCCAAACCAGAGCCTTCCATCC
K323A	CCCTGTCTCTATTTTATTTAATAGAGGAGAGGCGG
K347A, K356A	CATCGACCCAAAGGGTCAGACCGTCTCACACAAACAATCCCAGGTAATCTAGAG

Supplemental Table 1. Forward primer sequences for Tax2 site-directed mutagenesis.

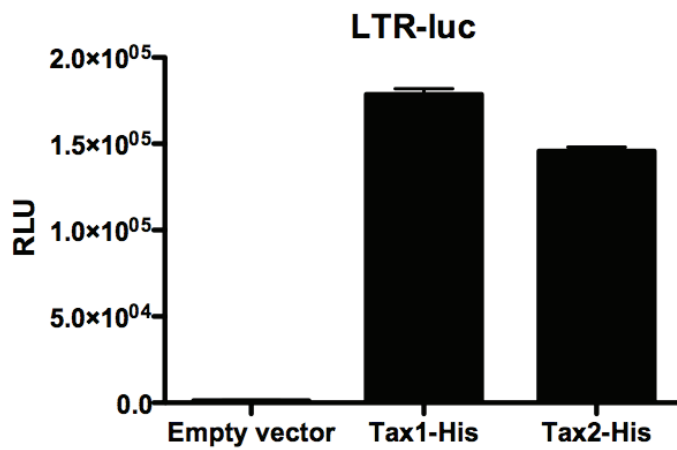


Figure S1. Tax2-His efficiently transactivates the viral promoter.

HeLa cells were transfected with an HTLV1-LTR-luc construct together with either an empty vector or a Tax1-His- or Tax2-His-encoding vector. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 3 independent experiments.

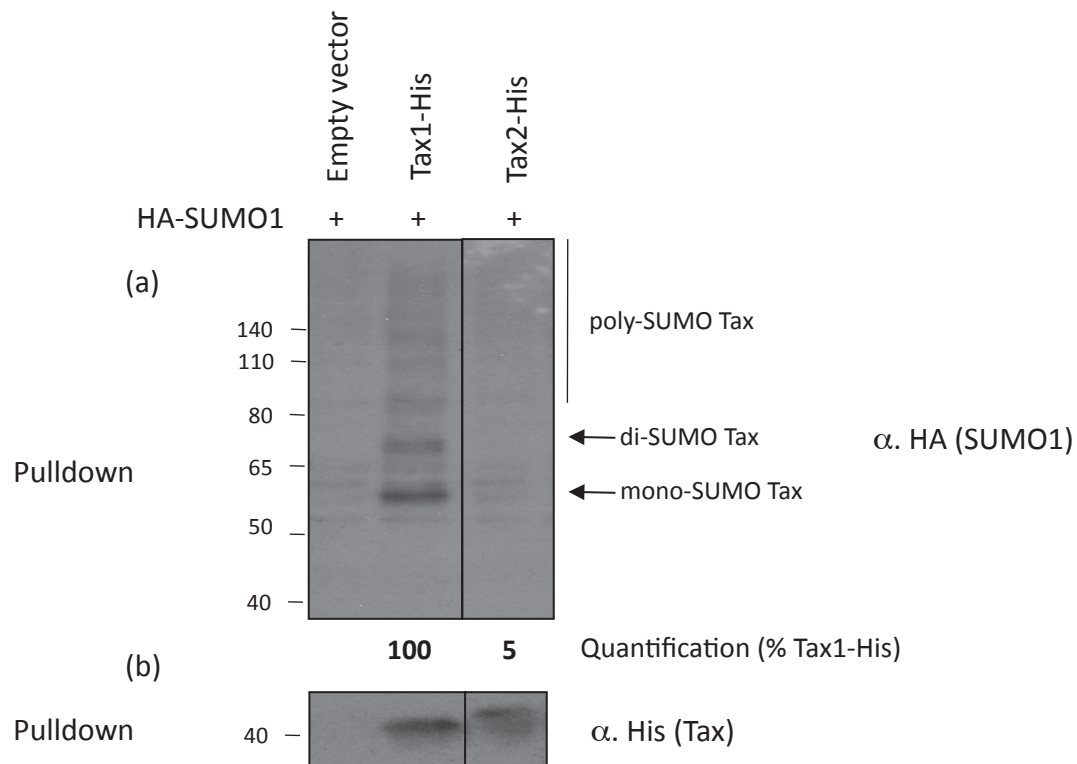


Figure S2. Tax2-His is barely SUMOylated by SUMO-1.

293T cells were transfected with 2 μ g of an empty pSG5M vector, of a Tax1-His- or of a Tax2-His-encoding vector, and 10 μ g of HA-SUMO1-encoding vector. (a) Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using an anti-HA antibody. (b) Levels of purification of Tax1-His and Tax2-His were determined by western blot using an anti-His antibody. See Materials and Methods for quantification method.

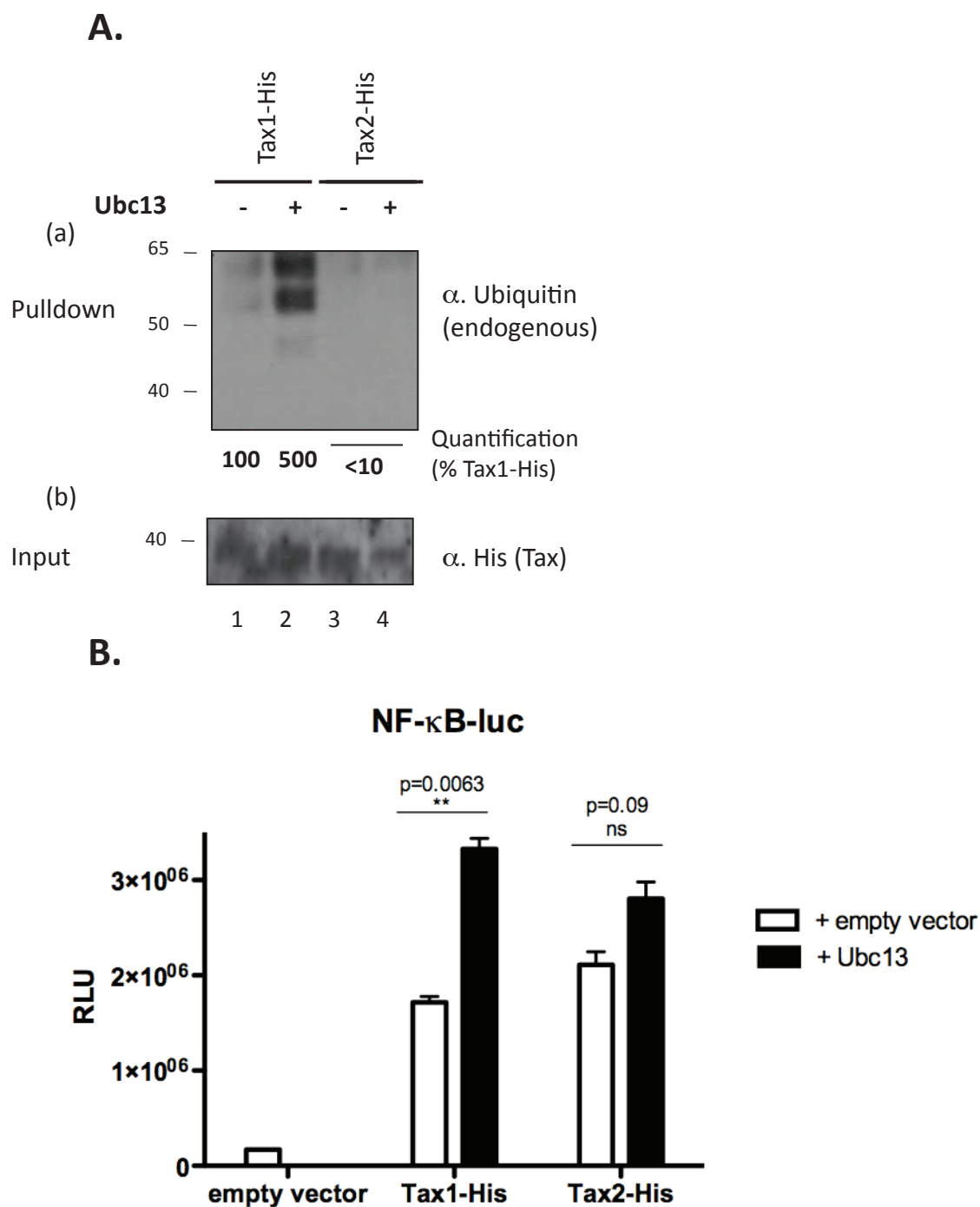


Figure S3. Tax2 is not targeted by Ubc13.

(A) HeLa cells were transfected with 1 μ g of an empty pSG5M vector, an untagged Tax1- (Irr), a Tax1-His- or a Tax2-His-encoding vector, together with 5 μ g of an Ubc13-encoding vector or of an empty vector, as specified. Histidine-tagged Tax proteins and their modified forms were retained on Ni-NTA beads and processed for western blot analysis using anti-ubiquitin antibodies (a). (b) Levels of expression of Tax1-His and Tax2-His in input were determined by western blot using an anti-His antibody.

(B) HeLa cells were transfected with a NF- κ B-luc construct together with either a Tax1-His- or Tax2-His-encoding vector, in the absence (+empty vector) or presence (+Ubc13) of an Ubc13-encoding vector (1 μ g), as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in duplicate and is representative of 2 independent experiments. Results of t-tests are shown (**, $p < 0.01$; ns, non significant).

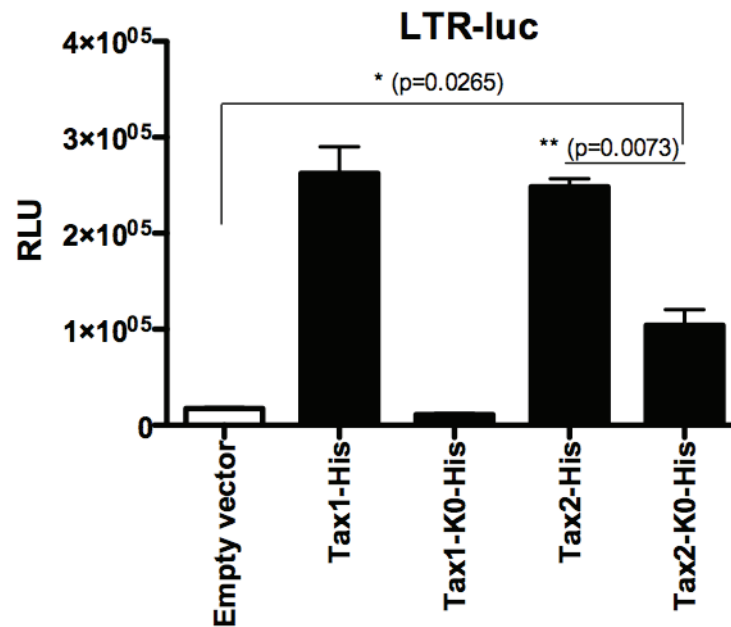


Figure S4. HeLa cells were transfected with an HTLV1-LTR-luc construct together with either an empty vector or with wild-type or lysineless Tax1-His- or Tax2-His-encoding vectors, as indicated. Eighteen hours later, luciferase activity was measured and normalized. Results are shown as mean RLU \pm SEM. The experiment shown was performed in triplicate and is representative of 3 independent experiments. Results of t-tests are shown (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).